

1810

RICERCHE SUL " CALORE ROSSO " DELLE PELLI SALATE

**II. Isolamento e caratterizzazione
degli agenti microbici causanti l'alterazione**

*Nota relativa ad un gruppo di ricerche eseguite con il contributo
del Dipartimento di Agricoltura U. S. A. (Legge Pubblica 480)*

Estratto dai « Bollettini della Stazione Sperimentale
per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti »
Vol. XXXVIII - Aprile - Giugno 1962 N. 2-3

Premessa

Nel prosieguo delle indagini intese ad accertare la causa primaria e le cause concorrenti all'alterazione nota come « calore rosso » delle pelli bovine salate (14), riuniamo, nella presente nota, i risultati più significativi finora acquisiti intorno al vasto e complesso problema.

E, siccome era necessario evidenziare e caratterizzare l'agente o gli agenti microbici specifici onde potere procedere nel piano di sperimentazione prefissato, abbiamo ritenuto, per l'appunto, individuare i microrganismi responsabili del danno.

Lo studio approfondito delle loro caratteristiche morfo-fisiologiche e, particolarmente, delle loro attività metaboliche, come verrà qui di seguito indicato, ci consentirà di poter affrontare l'indagine sulla conoscenza del modo con cui la microflora specifica s'impianta, resta latente o si sviluppa nel tessuto dermico, nonchè permetterà di stabilire la maniera con cui detta microflora penetra nel tessuto stesso ed ancora quali modificazioni induce alla struttura fisica ed alla composizione chimica dei costituenti la pelle medesima.

Materiali e Tecniche.

Il materiale, oggetto delle presenti indagini, era costituito da gropponi di pelli bovine Packers, salate fresche e piegate a pacchi, provenienti dagli Stati Uniti d'America e spedite, via mare, dalla Chilewich & Sons di New York, tramite la Sadesa di Rotterdam.

Le pelli in parola, del peso medio di 16-19 kg, erano rappresentate da gropponi muniti di coda, con pelo umido e fermo, di colore bruno; la carne era asciutta e molto grassa al tatto; presentavano, inoltre, sul « lato carne », macchie rosse, talora isolate, tal'altra confluenti, quasi sempre molto estese.

umidicce, limose, rilevate, unitamente a residui di sterco, di terreno e di sudiciume vario.

Le macchie rosse erano maggiormente evidenti sui fianchi; comunque, in genere, sui lati che durante tutto il periodo di trasporto avevano maggiormente subita l'influenza dei fattori dell'ambiente esterno [Formisano (14)]. Sul « lato fiore » non era osservabile alcuna apparente anomalia: il pelo, infatti, resisteva tenacemente allo sforzo di trazione; mancavano zone o chiazze depilate; erano presenti, soltanto, terriccio, sterco, sudiciume vario.

Da queste pelli vennero prelevati dei dischi (da numerosi punti) sui quali più evidenti erano le colorazioni rosse. Detti dischi vennero sommersi in acqua distillata sterile col 30% di NaCl. Si utilizzò per le prime prove, il metodo della diluizione di Hiltner e Störmer, su campionature medie e si allestirono le piastre. Il liquido diluente era acqua distillata con il 30% di NaCl e le diluizioni furono spinte fino a 10^{-9} .

Metodi per gli esami morfo-fisiologici.

a) Le indagini morfologiche sui germi sono state eseguite con preparati a fresco e colorati in microscopia ottica normale ed a contrasto di fase. Data la particolare natura dei germi in studio, il liquido disperdente era acqua distillata col 20% di NaCl. Le colorazioni semplici erano eseguite modificando il metodo classico e precisamente: dopo stemperamento del materiale da esaminare in acqua col 20% di NaCl, l'asciugamento avveniva a temperatura ambiente e comunque non superiore a 37°C e la fissazione si eseguiva con alcool etilico assoluto per 2 minuti. Si asciugava e si colorava con fucsina carbolica di Ziehl per 1 minuto. Si lavava con acqua e si scolava con una soluzione alcool-acido (2,5 ml di alcool etilico e 2,5 ml di acido acetico glaciale venivano portati a 100 ml con acqua distillata) per 1 minuto. Si lavava e si asciugava.

Sono stati impiegati anche i colori acidi di anilina.

b) Gli elementi di resistenza ai fattori fisici dell'ambiente (conidi, gonidi, spore) venivano ricercati col metodo Müller emend. Lehmann e Neuman (13) e col metodo Bonaduce-Londrillo (4), entrambi modificati per adattarli alla particolare specificità dei nostri germi e, contemporaneamente, saggiandone la termoresistenza (a 70°C , a 80°C e a 90°C).

c) La Gram-reazione veniva stabilita modificando il metodo classico come segue: dopo sgrassatura del vetrino alla fiamma, si aggiungeva una goccia di acqua-sale (20% di NaCl); si stemperava il materiale microbico e si asciugava in stufa a 37°C , indi si fissava per 2 minuti con alcool

assoluto. Si eliminava l'alcool in eccesso senza lavaggio; si colorava per 4 minuti con soluzione di Erlich; si scolorava con alcool-acido (v. sopra) per 1 minuto; si trattava con soluzione jodio-jodurata di Lugol per 1 minuto; si eliminava l'eccesso senza lavare; si scolorava con alcool jodato [sec. Andrieu e coll. (13)] per 1 minuto; si lavava con acqua; si colorava con soluzione di contrasto (fucsina acquosa al 0,1%) per 1 minuto; si scolorava con alcool-acido per 1 minuto; infine si lavava con acqua, si asciugava in stufa a 37°C e si osservava estemporaneamente.

d) La mobilità delle cellule veniva stabilita introducendo tra copri e portaoggetti di un preparato a fresco, una goccia di mitigante (cloroformio o soluzione jodio-jodurata di Lugol).

e) La presenza di inclusioni protoplasmatiche nelle cellule veniva ricercata in microscopia a contrasto di fase e col metodo di Neisser (3).

f) L'influenza degli alcali e degli acidi, come indagine citochimica sui costituenti cellulari, è stata saggiata con: NaOH; CH₃COOH e H₂SO₄ al 5 ed al 50%.

Metodi per gli esami colturali.

Sono stati impiegati i seguenti substrati:

- 1) *agar e brodo comune di carne*;
- 2) *agar glucosato*;
- 3) *agar avena*;
- 4) *agar Baldacci*;

preparati secondo la metodica corrente.

Poi, i seguenti substrati speciali: di essi alcuni già noti, altri da noi stessi elaborati (*):

- 5) *agar sale sec. Anderson* (2). (estratto di carne 10, peptone 10, agar 20, acqua q. b. a 1000, cloruro sodico 275, pH finale: 7,5).

(*) I prodotti impiegati devono essere puri; precisiamo che il cloruro sodico deve essere esente da magnesio. L'agar da noi adoperato era il Bacto-Difco; il peptone della Costantino. Indichiamo anche che quando non viene diversamente specificato, la sterilizzazione si effettua a 120°C per 20 minuti.

6) *patate salate*. (patate a becco di clarino vengono poste in acqua distillata fino ad essere sommerse; si aggiunge allora il 27,5% di cloruro sodico ed il 5% di carbonato di calcio. Si porta il tutto in pentola di Koch per un'ora, indi si sciacquano per pochi secondi in acqua distillata).

7) *decotto di patata salata*. (g 250 di patate si pongono in 1000 cc. di acqua distillata contenente il 27,5% di cloruro sodico ed il 5% di carbonato di calcio; indi il tutto portato per un'ora nella pentola di Koch; segue la filtrazione per tela).

8) *agar pelle sale*. (200 g di pelle fresca di vitello vengono mantenuti in 1000 cc. di acqua, a 135°C per un'ora, indi si filtra, si aggiungono g 250 di cloruro sodico, si porta a volume, si agarizza col 2% di agar).

9) *terreno « B » di Lochhead* (22). (g 453 di merluzzo salato, passati al setaccio, vengono sospesi in 1000 cc. di acqua. Si pone per 1 ora nella pentola di Koch, indi si filtra per tela e si aggiungono: peptone 1, glicerina 5, agar 15, cloruro sodico 275 e si riporta a volume).

10) *agar patate sale*. (patate g 200, carbonato di calcio g 50, acqua cc. 1000. Si tratta il tutto per 1 ora a 120°C, si filtra a caldo e si aggiungono: glucosio g 10, agar g 20, cloruro sodico g 275; pH finale corretto a 7,2).

11) *terreno « sintetico » arricchito sec. Anderson* (2). (si pesa 1 g di estratto di lievito e si impasta con acqua fino ad ottenere una crema poco densa; si aggiungono 2 gocce di acido cloridrico concentrato e si porta a 100 cc con alcool puro; si agita ripetutamente e si filtra. A parte si mescolano: fosfato sodico-ammonico g 10, cloruro potassico g 1, solfato di magnesio g 1, glucosio g 10. Si aggiungono, allora 20 ml di soluzione alcoolica di lievito, agar lavato g 25, acqua q. b. a 1000 cc., cloruro sodico g 275).

12) *terreno « C » di Lochhead* (22). (si sterilizzano separatamente: a) 500 cc di latte scremato fresco (a pH 7, 4); b) 15 g di agar in 200 cc. di acqua; c) 240 g di cloruro sodico). Gli ingredienti caldi si mescolano in un solo erlenmeyer versando il latte sul sale e questo miscuglio all'agar. Viene aggiunta quindi altra acqua calda a poco a poco e, sempre agitando, si porta ad un volume di 1000 cc.

13) *substrato pelle mannite caseina*. (pezzi di pelli Packers salate e rinverdite vengono sterilizzati in acqua distillata; si lascia a riposo per circa due mesi, poi si elimina lo strato dell'epidermide coi peli e la parte che rimane viene tritata e filtrata. Al liquido si aggiungono: mannite 10, caseina sodica 2, peptone 1, agar 15, cloruro sodico 225, acqua q. b. a 1000 cc.).

14) *substrato pelle sale riso di Clayton e Gibbs, modificato* (9). (g 453 di pelle di vitello, scuoiato da poco, posti in 1000 cc. di acqua distillata, vengono tenuti nella pentola di Koch per un'ora. Al liquido pressato, prove-

niente da questa digestione, si aggiungono 0,1% di peptone e 27,5% di cloruro sodico. Di questo substrato, 20 cc. vengono aggiunti a 5 g di riso brillato, in un erlenmeyer da 50 cc. Il tutto si sterilizza a 135°C per 30 min.).

15) *agar sale Vidalin* (*). (all'agar sale sec. Anderson, dopo sterilizzazione, si aggiungono ml 0,01 di Vidalin).

16) *terreno « A » di Lochhead* (22). (estratto di carne 3, estratto di lievito 3, peptone 10, amido solubile 10, agar 15, cloruro sodico 275, acqua distillata q.b. a 1000 cc.).

17) *brodo peptone di Stuart e coll.* (35). (peptone I, amido di patata I, solfuro di sodio I, carbonato sodico I, cloruro sodico I, acqua 100 cc.).

18) *agar fagioli sale*. (g 300 di fagioli vengono posti in 1000 cc. di acqua distillata; si porta ad ebollizione per 3 ore, si filtra e si aggiungono: estratto di lievito g I, agar g 20, cloruro sodico g 275). A parte, al momento dell'uso, lo stesso agar viene addizionato di 0,01% di Vidalin.

19) *silico gel brodo amido*. (brodo sale addizionato del 5% di carbonato di calcio e del 5% di amido solubile veniva fatto assorbire da silico gel a 40°C).

20) *pappa di patata agarizzata*. (patate g 500, acqua cc. 1000, cloruro sodico 275, carbonato di calcio g 50. Si tiene il tutto a 120°C. per 1 ora; si raffredda, si schiacciano le patate, si filtra per tela, e, alla pappa così ottenuta, si aggiunge il 2% di agar).

Metodi per gli esami biochimici.

Per la ricerca dell'attività proteolitica, si è impiegato l'*agar sale gelatina sec. Anderson* (2). Si aggiunge all'agar sale 0,25% di gelatina e si distribuisce in piastre. Queste, insemminate e mantenute in termostato a 33°C, dopo otto giorni vengono sottoposte al saggio dell'attività proteolitica mediante acido tricloroacetico al 5%.

Per la ricerca dell'attività caseinolitica si è adoperato l'*agar sale caseina sec. Anderson* (2): 0,5 g di caseina pura vengono sospesi in 8 ml di acqua distillata; si aggiunge una goccia di fenolftaleina (all'1% in alcool-acqua) e NaOH N fino ad ottenere una colorazione rosa permanente; si riscalda leggermente la soluzione e si porta a 10 cc. 5 cc. di tale soluzione

(*) Complesso vitaminico della Abbott di Chicago.

vengono aggiunti a 100 cc. di agar sale. Indi si procede come per la prova su agar sale gelatina.

Per la ricerca dell'attività lipolitica, abbiamo adoperato *agar Berry modificato* (13). Si parte da agar sale (estratto di carne 10, peptone 10, agar 20, cloruro sodico 275, acqua 1000 cc., pH finale 7,5) che si distribuisce in provette in ragione di 10 cc.; in ognuna di esse si aggiungono g 0,5 di burro liquefatto e di buona qualità. Si raffredda a 45°C, si mescola bene il grasso e si versa in piastre di Petri sterili e fredde. Si insemenza e si mantiene a temperatura ambiente. Dopo 20 giorni si saggia l'attività con soluzione satura di CuSO₄.

Per la prova di riduzione, si è impiegato *acqua peptonata al nitrato potassico* (peptone 1, nitrato potassico 2, cloruro sodico 24, acqua 100 cc.). La attività riducente si saggia al 20° giorno di termostato a 35°C col reattivo di Griess.

Per la ricerca dell'attività amilolitica, si faceva ricorso all'*agar amido sale*. Brodo sale cc. 100, amido solubile g 0,2, asparagina g 0,005, agar g 2. L'attività amilolitica veniva saggiata con soluzione di jodio in alcool a 50° dopo permanenza a 35°C per 20 giorni.

L'assimilazione e le prove di fermentazione sono state condotte su brodo sale con l'aggiunta del 2% di: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, saccarosio, lattosio, raffinosiso, xilosio, glicerina, mannite. Si sono impiegati tubi Durham e si sono ricercati: *a*) gas, *b*) reazione, *c*) ac. acetico (secondo Custance e Higgins (11), mediante p-dimetilamino-benzaldeide ed ac. solforico); *d*) ac. butirrico (secondo Allgeier e coll. (1), come butirrato di rame con cloroformio); *e*) ac. lattico (secondo Markus (25) mediante p-idrossidifenile).

L'assimilazione delle proteine e il saggio dell'attività ammonizzante sono stati ricercati in brodo sale con l'aggiunta dei seguenti aminoacidi: 0,1% di: glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, prolina, istidina, tirosina, miscuglio (0,01%) di ognuno dei predetti.

L'ammoniaca è stata saggiata col reattivo di Nessler su distillato in corrente di vapore e fotometricamente (colorimetro di Evans).

L'influenza di alcuni fattori di crescita è stata saggiata in brodo sale con l'aggiunta di 0,01 ml delle seguenti vitamine della C. Erba di Milano; Vit. A (« Asteril »: 25.000 U. I. in 1 cc. di olio di oliva); Vit. B₁ (« Beta-steril »: 10 mg in 1 cc. di acqua bidistillata); Vit. B₂ (« Betaflavina »: mg 5 di 6,7-dimetil-9-(1'-D-ribitil)-isoallossazina e mg 5 di salicilato sodico in 1 cc. di acqua distillata); Vit. B₆ (« Esa-B »: mg 10 di 2-metil-3-ossi-4,5-di (ossimetil) piridina cloridrato in 1 cc. di acqua); Vit. C (« Ascorbina » mg 100 di acido l-ascorbico in 2 cc. di acqua distillata); Vit. D₂ (« Radiosterina »: mg 5 (= 200.000 U. I.) in 1 cc. di olio d'oliva); Vit. E (« Toferol »)

α -tocoferolo acetato mg 30 in eccipiente q. b. a. g 0,3: 10 compresse venivano sospese in 100 cc. di acqua e fortemente agitate fino a completa dispersione); Vit. K₁ (« K-Trombina »): mg 20 di 2-metil-1,4 naftochinone bisolfito sodico in 1 cc. di acqua distillata; complesso « vidalin » della Abbott di Chicago [cc. 0,6 contengono: Vit. A 5.000 U. S. P. + Vit. D. 1.000 U. S. P. + Vit. B₁ (cloridrato di tiammina) mg 1,5 + Vit. B₂ (riboflavina) mg 1,2 + Vit. B₆ (cloridrato di piridossina) mg 0,5 + Vit. C (acido ascorbico) mg 50 + Vit. PP (nicotinammide) mg 10 + Vit. B₁₂ mcg 3].

La ricerca dell'idrogeno solforato è stata eseguita in brodo sale e con cartine all'acetato di piombo.

L'indolo è stato saggiato col metodo di Salkowski (13).

Il cloruro sodico è stato ricercato secondo Mohr.

Le curve di crescita sono state determinate spettrofotometricamente (spettrofotometro Beckman mod. D. U.) a 605 μ .

Per le prove di coagulazione e di peptonizzazione è stato adoperato il terreno « C » di Lochhead non agarizzato.

La reazione, dopo 20 giorni di termostato a 35°C, è stata determinata potenziometricamente (potenziometro Beckman H2).

La produzione di acidi e di alcali è stata saggiata in brodo sale glucosio con l'1% di rosso neutro (soluzione acquosa all'1%) e in brodo lattosio sale col 0,5% di rosso fenolo (soluzione all'1% in carbonato sodico N/10).

La crescita, col variare della concentrazione idrogenionica del mezzo, è stata studiata su agar sale tamponato secondo McIlvaine (26). Ben s'intende che la reazione è stata determinata potenziometricamente prima e dopo sterilizzazione.

Per il saggio dell'alofilia è stato adoperato l'agar sale con varie percentuali di NaCl.

La natura del pigmento è stata stabilita: *a*) per filtrazione attraverso filtro Berkefeld 11/N e *b*) per pressione attraverso pressa Buchner a 500 atm. Il substrato, che nelle nostre ricerche è risultato elettivo per l'intensificarsi delle pigmentazioni dei germi, era rappresentato dalla pappa di patate agarizzate e da noi ideato.

La solubilità del pigmento è stata ricercata con i seguenti solventi: alcool etilico, metilico, cloroformio, etere etilico, etere di petrolio, benzolo, xilolo, acetone, piridina, toluolo. Inoltre è stata saggiata la solubilità in acqua e in acido solforico concentrato, a freddo e a caldo. La formazione di leucoderivati è stata saggiata, nel tempo, con alcoli ed eteri.

Sono state, infine, eseguite prove di reinfezione, coi germi isolati, per la riproduzione dell'alterazione su pelli salate fresche.

A parte e nelle tabelle e grafici sono riuniti i caratteri microbiologici dei diversi ceppi.

RISULTATI (*)

Descrizione dei ceppi.

Furono isolati, in totale, in coltura pura, 236 ceppi microbici fra schizomiceti, actinomiceti, blastomiceti ed ifomiceti. Questi ultimi tre gruppi, in quanto costituivano flora epifittica commensale, senza alcuna specifica partecipazione al processo alterativo comunemente detto di « calore rosso » furono tralasciati, mentre tutti gli schizomiceti, in totale 97, furono sottoposti ad indagine. Di essi 71 risultarono, su agar sale sec. Anderson, a pigmento rosso; 14 a pigmento giallo-bruno e 12 jalini, sempre sullo stesso substrato.

In definitiva, dopo il completamento delle indagini microbiologiche, i ceppi sono stati ridotti a 11 di cui 9 a pigmento rosso più o meno intenso e 2 jalini.

Tutti i ceppi isolati e descritti nella presente nota, non si sviluppano sui comuni terreni nutritivi con normale concentrazione di sale, nè sui seguenti specifici substrati: agar e brodo Lochhead « A »; agar e brodo peptone di Stuart e coll. (35); agar e brodo di Courington (10); agar e brodo fagioli sale; silico gel impregnato con brodo sale amido.

Qui di seguito viene data la descrizione particolareggiata dei ceppi studiati i quali conservano il numero originario di collezione.

CEPPO N. 13

Halobacterium halobium Petter emend. Elazari-Volcani.

Caratteri morfologici generali: il ceppo presenta un certo pleomorfismo specie con l'invecchiamento delle colture e più particolarmente: su *agar sale sec. Anderson* si rinvencono forme batteriche diritte o leggermente incurvate che in genere, intorno al 20° giorno, presentano un ingrossamento ad un estremo; diventano bitorzolute ed è facilmente rilevabile una considerevole granulazione all'interno delle cellule a cui segue la vacuolizzazione del protoplasma. Talora appaiono anche delle forme ovalari. Le forme a bacchetta misurano in media $\mu 2,21 \times 0,69$ (da $\mu 8,32 \times 0,90$ a $\mu 1,35 \times 0,45$); quelle subsferiche $\mu 0,85$ (fig. n. 1).

In brodo sale sec. Anderson, al 13° giorno di incubazione, si osservano forme batteriche di diversa grandezza, alcune sono vuote all'interno, altre rigonfie ad un estremo e sottili all'altro.

Misurano in media $\mu 4,62 \times 0,87$ (da $\mu 11,88 \times 1,12$ a $\mu 1,80 \times 0,67$), le forme subsferiche misurano in genere $\mu 0,96$. Su *patata salata*, all'11°

(*) Ringrazio la Dott. Rosa Sordino per la collaborazione prestata nella esecuzione pratica di talune delle presenti ricerche.

giorno di incubazione, si hanno forme batteriche piccole e forme subsferiche (cocchi e coccobatteri). Su *decotto di patata salata*, all' 11° giorno di incubazione, le forme batteriche si presentano da allungate a tozze, a piccole; su *agar pelle sale*, al 13° giorno di sviluppo, le forme batteriche appaiono piccolissime quasi come dei coccobatteri; in *brodo pelle sale*, al 13° giorno di incubazione, le forme batteriche vanno da allungate a piccole; su *agar Lochhead B*, al 13° giorno di sviluppo, si hanno forme batteriche di lunghezza media; in *brodo Lochhead B*, al 13° giorno di incubazione, forme batteriche molto allungate e forme batteriche di lunghezza media; su *agar*



Fig. n. 1

patate sale, al 15° giorno di incubazione, forme batteriche piccole; in *brodo patate sale*, al 15° giorno di sviluppo, forme batteriche da molto allungate a piccole; su *agar sintetico arricchito secondo Anderson*, al 17° giorno di sviluppo, si hanno forme batteriche di lunghezza media e forme piccolissime; in *brodo sintetico arricchito sec. Anderson*, al 17° giorno di sviluppo, forme batteriche da allungate a molto piccole; su *agar Lochhead C*, al 10° giorno di sviluppo, si osservano forme batteriche molto piccole e forme subsferiche (coccobatteri); su *agar pelle mannite caseina*, al 18° giorno di incubazione, forme batteriche da medie a piccolissime e forme subsferiche (coccobatteri); in *brodo pelle mannite caseina*, al 18° giorno di sviluppo, forme batteriche allungate; su *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*, al 18° giorno di sviluppo, forme batteriche da piccole a piccolissime e forme subsferiche (coccobatteri); in *brodo pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*, al 18° giorno di sviluppo, forme batteriche allungate.

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O₂/lt.).
Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec.
Anderson.

Termoresistente a 70°C per 10' (v. tab. n. 5).

Optimum di pH = 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza
pH = 6,0 - 8,0 (si veda anche la tab. n. 2).

Alofilo obbligato. Limiti di salinità (espressi in NaCl) 20-32% (v. tab. n. 3).

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.

Colorazione degli elementi di conservazione (sec. Müller, emend.
Lehmann e Neuman e ulteriormente da noi modificato e secondo Bonaduce-
Londrillo modificato); si osservano cellule subovalari colorate in rosso in un
campo in cui si rinvengono forme mal definite, colorate in bleu pallidissimo.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: positiva.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e
dagli alcali, fisiologicamente, sotto campo microscopico. Alcune cellule
presentano, però, considerevoli granulazioni interne, altre sono vacuolizzate
ed altre hanno rigonfiamenti agli estremi.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson
al 7° giorno di incubazione a 35°C: 5 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla fig. n. 20.

Osservazione macroscopica: su *agar sale sec. Anderson*, all'8° giorno
di sviluppo, patina abbondantissima; uniformemente rossa; mucosa; a
margini interi; scolante verso il fondo ed arrossamento del liquido di con-
densazione. In *brodo sale sec. Anderson*, all'8° giorno di incubazione, intor-
bidamento, formazione di un anello superficiale sul pelo libero del liquido
marcatamente rosso, deposito abbondante rosso al fondo. Su *patata salata*,
all'8° giorno di sviluppo, patina abbondante, rilevata, rossa, mucosa, a
margini interi. In *decotto di patata salata*, all'8° giorno di incubazione,
intorbidamento, colorazione rossa della massa liquida e formazione di depo-
sito rosso al fondo. Su *agar pelle sale*, al 9° giorno di incubazione, patina
abbondantissima, rosea, umida, a margini interi, con coloniette isolate rosse,
non scolante verso il fondo. In *brodo pelle sale*, al 9° giorno di incubazione,
intorbidamento con formazione di velo lungo la parete del tubo, liquido
roseo; scarso deposito rosso al fondo. Su *agar Lochhead B*, al 9° giorno

di incubazione, patina abbondante, ammattita nei punti jalini, rilevata e mucosa nelle zone rosa carico, a margini netti, non scolante verso il fondo, con lieve deposito rosso nel liquido di condensazione. In *brodo Lochhead B*, al 9° giorno di incubazione, intorbidamento, lieve deposito jalino al fondo. Su *agar patate sale*, all'8° giorno di incubazione, sviluppo scarso, colonie isolate, crateriformi, rosse al centro, pressochè jaline alla periferia, mucose, rilevate a margini interi. In *brodo patate sale*, all'8° giorno di incubazione, lieve intorbidamento, scarso deposito rosso al fondo, assenza di sviluppo superficiale. Su *agar sintetico arricchito di Anderson*, al 17° giorno di incubazione, patina scarsissima, rosea, lievemente umida. In *brodo sintetico arricchito di Anderson*, al 17° giorno di incubazione, sviluppo scarsissimo, leggero intorbidamento. Su *agar Lochhead C*, al 10° giorno di incubazione, patina scarsissima, con varie colonie isolate rosso vivo, sedimento rosso al fondo, arrossamento del liquido di condensazione. In *brodo Lochhead C*, al 10° giorno di incubazione, lieve arrossamento, deposito rosso al fondo. Su *agar pelle mannite caseina*, al 13° giorno di incubazione, patina abbondante, sotto forma di piccolissime coloniette affiancate, jalino-rosea, mucosa, non scolante verso il fondo; lievissimo deposito rosso nel liquido di condensazione. In *brodo pelle mannite caseina*, al 13° giorno di sviluppo, lieve intorbidamento. Su *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*, al 13° giorno di incubazione, assenza di sviluppo. In *brodo pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*, al 13° giorno di incubazione, assenza di sviluppo.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffinosio, mannite, glicerina. Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, xilosio (v. tab. n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).

Produce ammoniaca (v. tabella n. 4).

Non produce indolo.

Non produce idrogeno solforato.

Non produce acidi.

Non sviluppa gas.

Riduce lievemente i nitrati a nitriti.

Non è proteolitico, nè caseinolitico.

E' lievemente lipolitico (reazione giallo-verde in presenza di CuSO_4).

Amilolisi: assente.

Assimila i seguenti amminoacidi: molto (glicina); poco (tirosina, asparagina); pochissimo (valina, prolina, leucina, acido glutammico, istidina, miscela di tutti gli amminoacidi adoperati), (v. tabella n. 8).

Assimila le seguenti vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (v. tabella n. 10).

In latte salato (brodo Lochhead « C ») non è proteolitico.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca, il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (figura n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Il germe, per i suoi caratteri morfo-fisiologici, colturali e biochimici, è diverso dagli altri di cui qui di seguito si darà la diagnosi.

Secondo il Bergey's Manual of determinative bacteriology (10) il ceppo, da noi descritto, ha in comune con l'*Halobacterium halobium* Petter, emend. Elazari-Volcani, pressochè tutti i caratteri stabiliti per quest'ultimo.

CEPPO N. 14

Halobacterium cutirubrum Lochhead, emend. Elazari-Volcani,
var. *thermophilum*, n. var.

Caratteri morfologici generali: il ceppo presenta su quasi tutti i substrati una tipica forma batterica che si conserva anche nell'invecchiamento e più

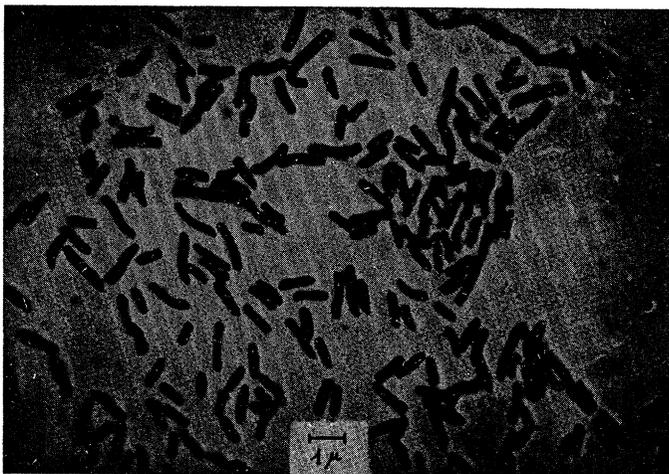


Fig. n. 2

precisamente: su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di sviluppo, si osservano forme batteriche talora slargate (figura n. 2), misuranti in

media μ $1,84 \times 0,65$ (da μ $6,97 \times 0,90$ a μ $1,35 \times 0,45$). In *brodo sale sec. Anderson*, al 13° giorno di sviluppo, le forme batteriche appaiono più allungate, piuttosto ispessite, talora riunite in catena, talaltra con gli estremi ricurvi, misuranti in media μ $4,30 \times 0,78$ (da μ $11,25 \times 1,12$ a μ $2,25 \times 0,45$).

Forme a bacchetta, di lunghezza variabile, si osservano sempre, intorno al 15° giorno di sviluppo, in *decotto di patata salata*; in *brodo pelle sale*; in *brodo Lochhead B*; su *agar patate sale*; in *brodo e su agar sintetico arricchito di Anderson*; su *agar pelle mannite caseina*. Accanto alla tipica forma batterica si rinvencono talvolta forme subsferiche (cocco-batteri) su *patata salata*, su *agar Lochhead B*, su *agar Lochhead C*. In *brodo mannite caseina* e su *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*, invece, si osservano sempre unicamente forme subsferiche.

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O_2 /lt.).
Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su *agar sale sec. Anderson*.

Termoresistente a 70°C per 10' (v. tabella n. 5).

Optimum di pH: 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza: pH = 6,0 - 8,0 (si veda anche la tabella n. 2).

Alotollerante. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 6 - 32% (v. tab. n. 3).

Optimum di temperatura: 37 - 40°C.

Optimum di umidità: 85%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.

Colorazione degli elementi di conservazione: negativa.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di *agar sale sec. Anderson*, al 7° giorno di incubazione a 35°C: 6 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla figura n. 20.

Osservazione macroscopica: all'8° giorno di sviluppo, presenta patina jalino-rosea su *agar sale sec. Anderson* e su *agar Lochhead C*, raggiata verso il fondo del tubo, mucosa, a margini leggermente ondulati, quasi a sinusoidi esatte. Assume, invece, un colore rosa carico su *agar pelle sale* e su *agar Lochhead B*: la patina appare umida, a margini netti, lasciando scolare verso il fondo un leggerissimo deposito roseo. E' tipicamente rossa su *patata salata*

e su *agar patate sale*. Nei mezzi liquidi si ha leggero intorbidamento, assenza di velo e solo talora si ha formazione di un lieve deposito. Il ceppo non dà patina appariscente, al 15° giorno di incubazione, su *agar e brodo pelle mannite caseina*, su *agar e brodo pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato* e su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: glucosio, saccarosio, raffinosio, mannite e glicerina.

Non assimila: fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, e xilosio (v. tabella n. 9).

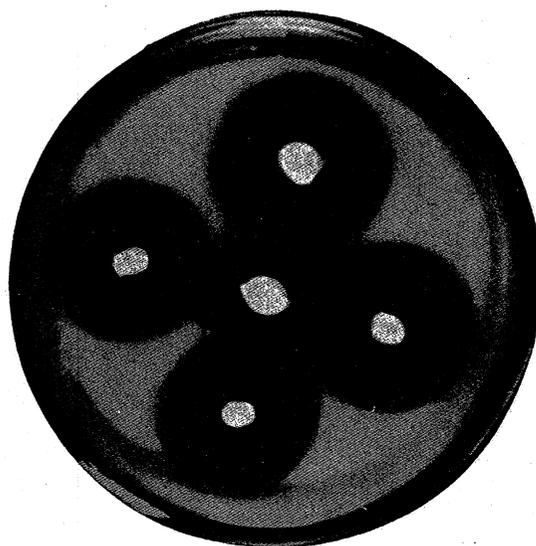


Fig. n. 3

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).

Produce ammoniaca (v. tabella n. 4).

Non produce indolo.

Non produce idrogeno solforato.

Non produce acidi.

Non sviluppa gas.

Riduce lievemente i nitrati a nitriti.

E' fortemente proteolitico (fig. n. 3) e caseinolitico.

Non è lipolitico.

Amilolisi: assente.

Non assimila alcuno degli aminoacidi adoperati (v. tab. n. 8).

Assimila le vitamine B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vedere tabella n. 10).

In latte salato (brodo Lochhead « C ») è proteolitico e peptolitico: coagula il latte, ridiscioglie il coagulo con abbondante separazione di siero, coagulo fessurato.

Prove di reinfezione.

Su pelle fresca salata, il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (figura n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Questo ceppo ha diversi caratteri in comune con *Halobacterium cutirubrum* Lochhead emend. Elazari-Volcani. Si differenzia però, in quanto non presenta un polimorfismo marcato come accettato per quest'ultimo (solo su taluni substrati si rinvengono, infatti cellule sferiche); è immobile e termoresistente (a 70°C per 10'); riduce lievemente i nitrati a nitriti; produce ammoniaca; non produce idrogeno solforato; è oltrechè proteolitico, anche caseinolitico. Questi caratteri, riteniamo, non consentano una esatta identificazione con la specie di Lochhead, ma giustificano la creazione di una varietà a parte e pertanto noi proponiamo di attribuire al ceppo da noi isolato e descritto il nome di: *Halobacterium cutirubrum* Lochh., var. *thermophilum* n. var.

CEPPO N. 17

Sarcina litoralis Poulsen

Caratteri morfologici generali: le cellule, in genere, sono subovalari, isolate, talora riunite in due o tre elementi, raramente si presentano allungate; hanno scarse granulazioni all'interno. Su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di sviluppo, le forme subovalari misurano in media μ 0,97 (fig. n. 4).

Le forme leggermente allungate invece: μ 2,15 \times 0,69 (da μ 4,27 \times 0,90 a μ 1,35 \times 0,45). In *brodo sale sec. Anderson*, al 13° giorno di sviluppo, le cellule non hanno contorno netto, si presentano talora vuote internamente, e misurano in media μ 0,94. Le forme leggermente allungate sono tozze, talora sottili, misurano in media μ 3,45 \times 1,73 (da μ 5,10 \times 2,80 a μ 1,80 \times 0,67). Forme tondeggianti si osservano sempre intorno al 13° giorno

su tutti i substrati adoperati. In *brodo pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*, e in *brodo pelle sale*, al 18° giorno si rinvergono, talora, anche forme un pò allungate.

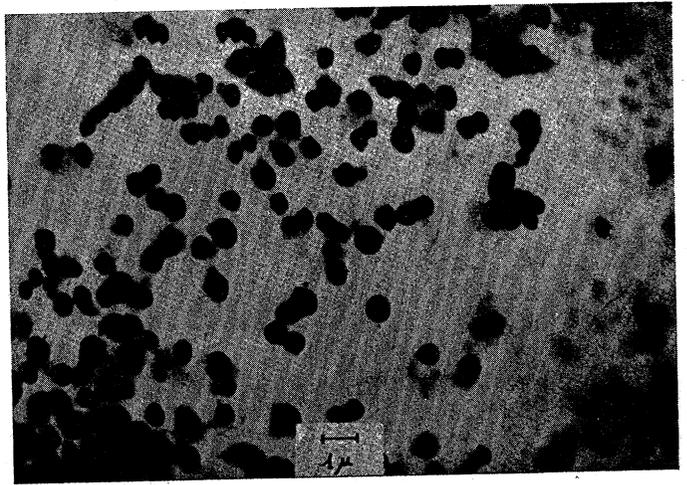


Fig. n. 4

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O₂/lt.).
Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec. Anderson.

Optimum di pH: 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza: pH: 6,0 - 8,0 (si veda anche la tabella n. 2).

Alofilo obbligato. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 27,5 - 32% (vedere tabella n. 3).

Optimum di temperatura: 33 - 37°C.

Optimum di umidità: 70%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali da noi adoperati: alcune cellule si presentano, però, fortemente vacuolizzate.

Caratteri culturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson al 7° giorno di incubazione a 35°C : 7 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla fig. n. 20.

Osservazione macroscopica: all'8° giorno di sviluppo, presenta patina marcatamente rossa, abbondante, mucosa, talora a margini frastagliati, tal'altra scolante verso il fondo su *agar sale sec. Anderson*, nonché su *patata salata*, su *agar Lochhead B*, su *agar Lochhead C*, su *agar pelle mannite caseina*, su *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato* e su *agar pelle sale*. Nei substrati liquidi, si ha intorbidamento, colorazione con sfumature da rosa a rosso, assenza di velo superficiale, deposito rosso al fondo; solo in *brodo sale sec. Anderson* e in *brodo pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato* si ha unicamente formazione di deposito rosso a mò di muschio al fondo. In *brodo Lochhead B* e in *brodo pelle mannite caseina* si ha solo lieve intorbidamento. Non dà patina appariscente al 15° giorno di sviluppo, su *agar patate sale*, su *agar brodo sintetico arricchito di Anderson*.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, maltosio, lattosio, raffinosio, mannite e glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, arabinosio, xilosio (vedere tabella n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tab. n. 6).

Non produce ammoniaca (v. tab. n. 4).

Non produce indolo.

Non produce idrogeno solforato.

Non produce acidi.

Non sviluppa gas.

Non riduce i nitrati a nitriti.

Non è proteolitico, nè caseinolitico.

Non è lipolitico.

Amilolisi, presente ed intensa.

Assimila i seguenti amminoacidi: poco (tirosina, prolina, valina, istidina, acido glutammico); pochissimo (glicina e miscela degli amminoacidi adoperati). Non assimila l'asparagina (v. tab. n. 8).

Assimila tutte le vitamine adoperate (v. tab. n. 10).

In latte salato (brodo di Lochhead « C ») non è proteolitico.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca, il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (fig. n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Molti sono i caratteri morfo-fisiologici e biochimici di questo ceppo, comuni con *Sarcina litoralis* Poulsen.

La presenza di un certo polimorfismo nel nostro ceppo (forme allungate); una maggiore alofilia (non si sviluppa al di sotto del 27,5% di NaCl) e la mancanza di potere riducente sui nitrati, non sono sufficienti, riteniamo, per considerarlo una specie nuova. Stante alla descrizione riferita in Bergey's Manual, noi abbiamo esteso le indagini, le quali, in definitiva, serviranno, certamente a meglio caratterizzare la specie.

CEPPO N. 81

Micrococcus Riccardi n. sp.

Caratteri morfologici generali: il ceppo presenta su tutti i substrati una tipica forma sferica che si conserva anche nell'invecchiamento; le cellule appaiono isolate, ma spesso riunite in corte catene o in ammassi e più partico-

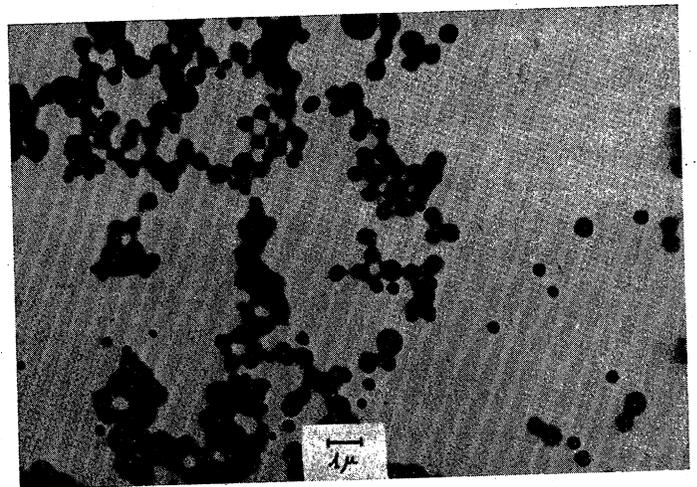


Fig. n. 5

larmente su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di sviluppo, si presentano leggermente appuntite su di un lato e talora avvolti da una sorta di membrana traslucida subrotonda. Misurano in media μ 0,80 (fig. n. 5).

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 19,27 di O₂/lt.).

Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec. Anderson.

Termoresistente a 80° per 10' (v. tab. n. 5).

Optimum di pH : 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza pH = 6,45 - 8,0 (si veda anche la tab. n. 2).

Alofilo obbligato. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 20 - 32% (tabella n. 3).

Optimum di temperatura: 37 - 40°C.

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.

Colorazione degli elementi di conservazione: si osservano cellule sub-ovalari colorate in rosso in un campo in cui si rinvengono forme mal definite colorate in bleu pallidissimo.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali da noi adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson al 7° giorno di incubazione a 35°C : 6 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla fig. n. 20.

Osservazione macroscopica: all'8° giorno di sviluppo presenta una patina di colore rosso intenso su: *patata salata* e su *agar patata sale*. Assume tonalità dal rosso al rosa pallido su *agar sale sec. Anderson*, *agar pelle sale*, *agar Lochhead B*, *agar Lochhead C*, *agar pelle mannite caseina*. In genere, la patina è slargata verso il fondo, abbondante, a margini netti, talora scolante nel liquido di condensazione, mucosa. Nei substrati liquidi dà intorbidamento e lieve deposito al fondo. Non si apprezza uno sviluppo positivo al 15° giorno su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: galattosio, saccarosio, raffiniosio, arabinosio, xilosio, mannite, glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, maltosio, lattosio (v. tab. n. 9).
Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).
Produce ammoniacca (v. tabella n. 4).
Non produce indolo.
Non produce idrogeno solforato.
Non produce acidi.
Non sviluppa gas.
Non riduce i nitrati a nitriti.
E' proteolitico (Fig. n. 6) e caseinolitico.

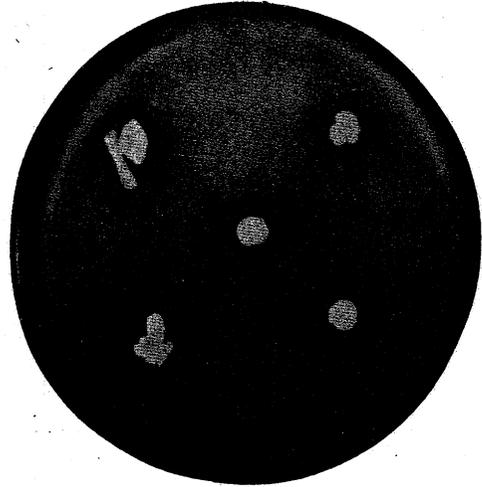


Fig. n. 6

Non è lipolitico.

Amilolisi: assente.

Assimila i seguenti amminoacidi: poco (prolina, leucina, asparagina); pochissimo (tirosina, valina, glicina, acido glutammico, miscela degli amminoacidi adoperati). Non assimila l'istidina (v. tab. n. 8).

Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vede tabella n. 10).

In latte salato (brodo Lochhead « C ») è proteolitico; coagula il latte e ridiscioglie il coagulo, con separazione di acqua bianca; coagulo spugnoso.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca, il ceppo riproduce l'alterazione detta di « cal rosso » (fig. n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Le caratteristiche morfo-fisiologiche e biochimiche di detto ceppo ed in particolare la forma sferica e streptococcica, la resistenza agli agenti fisici (riscaldamento fino a 80° per 10'), l'accentuata attività moltiplicativa, la presenza di enzimi proteolitici (proteasi, caseasi, peptidasi), la stretta alofilia, l'assimilazione di un più vasto numero di glucidi ed alcoli superiori; la scarsa utilizzazione degli amminoacidi; l'assimilazione delle vitamine ad eccezione della K₁, ed il mancato riscontro, per quel che ci consta, di specie già descritta con gli stessi caratteri; tutto ciò ci permette di considerare il ceppo come specie nuova.

Pertanto per esso proponiamo il nome di *Micrococcus Riccardi* n. sp., dedicandolo al Prof. Salvatore Riccardo, Direttore dell'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Napoli.

CEPPO N. 82

Halobacterium cutirubrum Lochhead, emend. Elazari-Volcani

Caratteri morfologici generali: il ceppo presenta, talora, su alcuni substrati un certo polimorfismo; in genere la forma tipica è quella batterica, allungata, isolata, misurante, su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di svi-

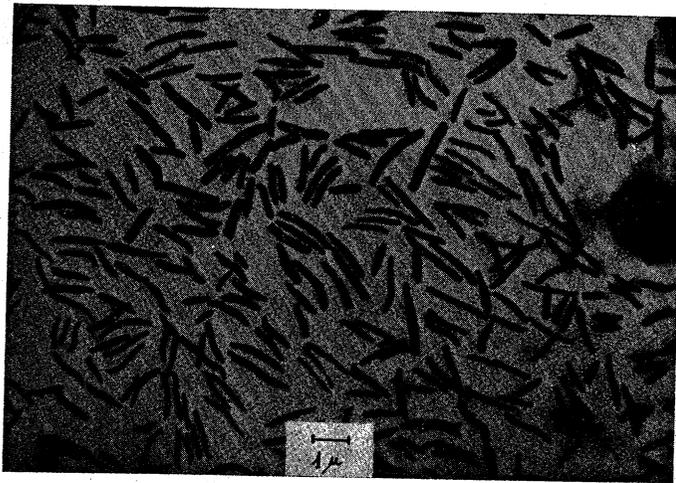


Fig. n. 7

luppo, in media $\mu 2,50 \times 0,47$ (da $\mu 8,55 \times 0,67$ a $\mu 1,80 \times 0,45$) (fig. n. 7) e su *brodo sale sec. Anderson*, al 13° giorno di sviluppo, misurante in media $\mu 6,96 \times 0,69$ con cellule talora molto allungate fino a $\mu 20,25 \times 0,90$. Ap-

paiono talora, e specie nell'invecchiamento, forme subsferiche, quasi cocco-
batteriche su: *patata salata*, *agar pelle sale*, *agar Lochhead B*, in brodo sin-
tetico arricchito di Anderson, su *agar Lochhead C*, in brodo pelle mannite
caseina, su *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*.

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O₂/lt.).
Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec.
Anderson.

Optimum di pH : 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza
pH = 6,45 - 8,0 (si veda anche la tab. n. 2).

Alotollerante. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 6 - 32% (v. tab. n. 3).

Optimum di temperatura: 33 - 37°C.

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e
dagli alcali da noi adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson a
7° giorno di incubazione a 35°C : 5 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla fig. n. 20.

Osservazione macroscopica: al 13° giorno di sviluppo la patina si pre-
senta jalina, abbondante, non scolante al fondo o talora formante un deposito
lievemente opaco, nell'acqua di condensazione su *agar pelle mannite caseina*
e su *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*; si presenta invece
jalina con lievissime sfumature rosee, o talvolta sulla patina jalina compaiono
quasi sovrapposte, coloniette isolate rosa più o meno intenso all'8° giorno su
agar sale sec. Anderson, su *agar pelle sale*, su *agar Lochhead B*, su *agar*
Lochhead C e la patina scola spesso verso il fondo; è mucosa, a margini netti
e talvolta, vista contro luce, assume un aspetto radiceiforme.

La patina è tipicamente rossa su *agar patate sale* e su *patata salata*;
quest'ultima il pigmento tende al rosso bruno; si ha sviluppo scarsissimo fin
al 17° giorno su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*. Nei substrati
liquidi si ha quasi sempre intorbidamento con assenza di velo superficiale
mentre al fondo compare spesso un deposito polverulento, tendente al rosso
vinoso e talvolta anche arrossamento dell'intera massa liquida.

Caratteri biochimici.

- Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffinoso, mannite, glicerina.
- Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, xilosio (v. tab. n. 9).
- Solubilità del pigmento: (v. tabella n. 6).
- Produce ammoniacca (v. tabella n. 4).
- Non produce indolo.
- Non produce idrogeno solforato.
- Non produce acidi.
- Non sviluppa gas.
- Riduce lievemente i nitrati a nitriti.
- E' proteolitico (fig. n. 8), ma non caseinolitico.
- Non è lipolitico.
- Amilolisi: assente.
- Assimila molto gli amminoacidi adoperati (v. tabella n. 8).
- Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vedere tabella n. 10).
- In latte salato (brodo Lochhead « C ») non è proteolitico.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (fig. n. 19).

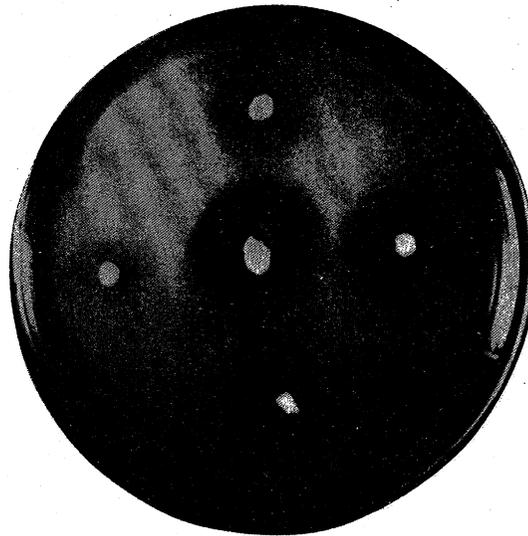


Fig. n. 8

Considerazioni tassonomiche.

Il ceppo qui descritto ha quasi tutti i caratteri in comune con *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari-Volcani. Si differenzia da esso unicamente per la maggiore lunghezza delle cellule (che raggiungono anche i μ 20 - 25) e per una più marcata assimilazione degli amminoacidi.

CEPPO N. 105

Micrococcus morrhuae Klebahn,
var. *lipolyticus*, n. var.

Caratteri morfologici generali: la forma tipica è subsferica, a cellule isolate o a due o in piccoli ammassi, raramente a catena, che però su taluni substrati acquista anche forma, più o meno allungata, di coccobatterio. Su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di sviluppo, le forme tondeggianti misurano in media μ 0,90, quelle coccobatteriche in media μ 2,38 \times 0,68 (da μ 3,60 \times 0,90 a μ 1,80 \times 0,45) (fig. n. 9); in *brodo sale sec. Anderson*,

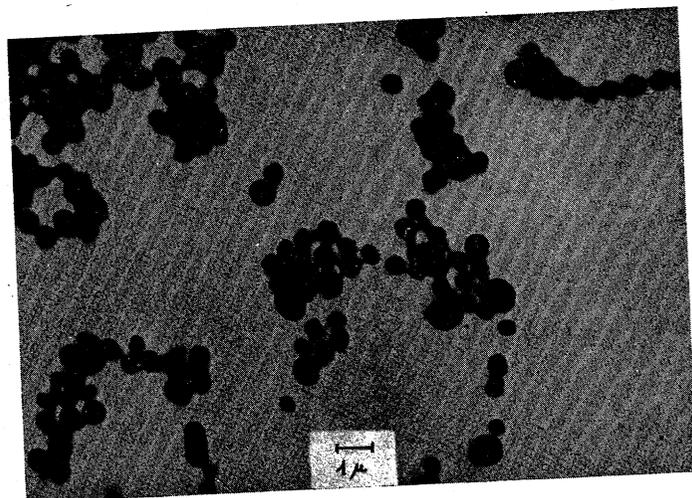


Fig. n. 9

al 13° giorno di sviluppo, le forme subsferiche misurano in media μ 1,01, si rinvengono spesso anche forme batteriche allungate, misuranti in media μ 4,05 \times 0,69 (da μ 10,35 \times 0,90 a μ 2,47 \times 0,45). La forma si conserva sempre subsferica anche su *patata salata*, in *decotto di patata salata*, su

pelle sale, su *agar Lochhead B*, su *agar patata sale*, su *agar e brodo pelle mannite caseina*. Oltre alla forma subsferica si rinviene talvolta la forma batterica più o meno allungata in genere in tutti i substrati liquidi.

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O₂/lt.).
Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su *agar sale sec. Anderson*.

Optimum di pH: 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza pH = 6,45 - 8,0 (si veda anche la tab. n. 2).

Alofilo obbligato. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 20-32% (tab. n. 3).

Optimum di temperatura: 33 - 37°C.

Optimum di umidità: 85%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali da noi adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di *agar sale sec. Anderson*, al 7° giorno di sviluppo a 35°C: 6 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla fig. n. 20.

Osservazione macroscopica: all'8° giorno di sviluppo, la patina è jalina tendente al roseo, slargata, mucosa, a margini netti, non scolante verso il fondo su *agar sale sec. Anderson*, *agar pelle sale*, *agar Lochhead B*, *agar patate sale*, *agar Lochhead C*. È invece rossa, umida, tendente al rosso mattone su *patata salata*. Nei substrati liquidi si ha leggero intorbidamento senza velo superficiale, con deposito talora jalino, talaltra roseo ed efflorescente verso il fondo. Non dà patina apprezzabile o talora macroscopicamente lo sviluppo è da considerarsi negativo su *agar e brodo pelle mannite caseina*, *agar e brodo pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*, su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*, fino al 17° giorno di termostato.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffinosio, mannite e glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio xilosio (v. tabella n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).
Produce ammoniaca (v. tabella n. 4).
Non produce indolo.
Non produce idrogeno solforato.
Non produce acidi.
Non sviluppa gas.
Riduce i nitrati a nitriti.
Non è proteolitico nè caseinolitico.
E' lipolitico.
Amilolisi: assente.
Non assimila alcuno degli amminoacidi adoperati (v. tab. n. 8).
Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vedere tabella n. 10).
In latte salato (brodo Lochhead « C ») non è proteolitico.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (fig. n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Per i suoi caratteri il ceppo da noi isolato e descritto rientra in *Micrococcus morrhuae* Klebahn. Alcuni caratteri fondamentali però lo distinguono: in primo luogo il nostro ceppo è lipolitico, in secondo luogo non è proteolitico, nè caseinolitico ed ancora è alofilo obbligato: non si sviluppa infatti ad una concentrazione in NaCl al disotto del 20%. Il possesso dell'attività lipolitica non è stato fino ad ora, e per quello che ci consta, messo in evidenza dai precedenti ricercatori per i germi alofili. Considerando che la degradazione dei grassi sia una importante azione metabolica, specie se si tiene in conto che le pelli Packers sono ricche in lipidi, riteniamo di poter considerare che il ceppo sia almeno una varietà della specie di Klebahn e proponiamo per esso il nome di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, var. *lipolyticus* n. var.

CEPPO N. 136

Halobacterium trapanicum Petter, emend. Elazari-Volcani

Caratteri morfologici generali: il ceppo si presenta quasi sempre sotto forma di batterio tipico, ad estremi netti, di lunghezza variabile; cellule isolate, talvolta in corte catene. Su *agar sale sec.* Anderson, al 19° giorno di

sviluppo, le cellule batteriche sottili appaiono avvolte da una membrana traslucida e gli estremi della cellula si presentano talora leggermente arcuati, e talvolta appare verso un estremo un corpo tondeggiante che all'esame in contrasto di fase, è meno rifrangente rispetto al rimanente corpo batterico. Le cellule misurano in media μ $1,90 \times 0,60$ (da μ $10,70 \times 0,90$ a μ $1,15 \times 0,45$) (fig. n. 10). In *brodo sale sec. Anderson*, al 13° giorno di svi-



Fig. n. 10

luppo, le forme batteriche spesso sono in catena e misurano in media μ $4,39 \times 0,69$ (da μ $11,88 \times 0,90$ a μ $2,25 \times 0,45$). La tipica forma batterica, più o meno allungata, si conserva anche nell'invecchiamento su tutti gli altri substrati liquidi e solidi.

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O_2 /lt.).
Immobile.

Gram - negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec. Anderson.

Optimum di pH: 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza :
pH = 6,45 - 8,0 (si veda anche la tabella n. 2).

Alotollerante, limiti di salinità (espressi in NaCl): 4 - 32% (tab. n. 3).

Optimum di temperatura: 33 - 37°C.

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.
Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.
Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi dagli alcali da noi adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson al 7° giorno di incubazione a 35°C : 7 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla fig. n. 20.

Osservazione macroscopica: la patina, all'8° giorno di sviluppo, è abbondante, jalina, con sfumature rosee, mucosa, a margini frastagliati, slargati, con leggero intorbidamento del liquido di condensazione, su *agar sale sec. Anderson*, su *agar pelle sale*, su *agar Lochhead B*, su *agar patate sale*, su *agar Lochhead C*, su *agar pelle mannite caseina*, su *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*. Si presenta con una patina marcatamente rossa, fino al rosso mattone su *patata salata*. Nei substrati liquidi si ha un più o meno intenso intorbidamento senza sviluppo, però, di velo superficiale e con deposito talora jalino, talaltra roseo fino a rosso intenso al fondo; la patina è scarsa, poco rilevata, anche al 15° giorno su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffinosiso, mannite, glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, xilosio (v. tabella n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).

Produce ammoniaca (v. tabella n. 4).

Non produce indolo.

Non produce idrogeno solforato.

Non produce acidi.

Non sviluppa gas.

Riduce i nitrati a nitriti.

Non è proteolitico nè caseinolitico.

Non è lipolitico.

Assimila molto bene tutti gli amminoacidi adoperati (v. tabella n. 8).

Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (v. tabella n. 10).

In latte salato (brodo Lochhead « C ») non è proteolitico.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca, il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (figura n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

I caratteri morfo-fisiologici e biochimici in particolare, avvicinano il ceppo da noi descritto ad *Halobacterium trapanicum* Petter, emend. Elazari-Volcani e, pertanto, riteniamo che ad esso debba essere riferito. Le altre attività biochimiche da noi studiate e i caratteri colturali più estesamente considerati, consentono una maggiore diagnosi differenziale per la specie di Petter.

CEPPO N. 150

Micrococcus morrhuae Klebahn,
var. *denitrolipolyticus*, n. var.

Caratteri morfologici generali: il ceppo presenta su tutti i substrati una tipica forma sferica che si conserva anche nell'invecchiamento. Gli elementi sono raramente riuniti in catena, mentre invece assumono spesso la disposizione a sarcina, misurano, al 19° giorno di sviluppo, in media su *agar sale*

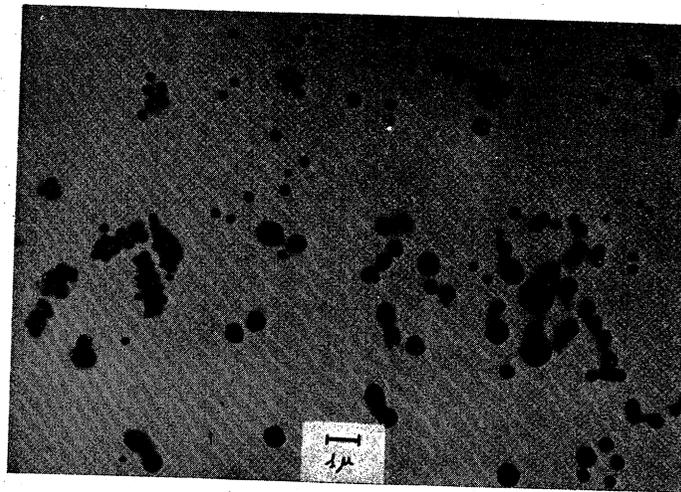


Fig. n. 11

sec. Anderson μ 0,90 (figura n. 11). Su *brodo sale sec. Anderson*, le cellule appaiono spesso internamente vuote, sono subsferiche e misurano in media μ 0,83.

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O₂/lt.).
Immobile.

Gram - negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec. Anderson.

Optimum di pH: 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza :
pH = 6,45 - 8,0 (si veda anche la tabella n. 2).

Alofilo obbligato; limiti di salinità (espressi in NaCl): 15 - 32% (tab. n. 3).

Optimum di temperatura: 33 - 37°C.

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici di anilina, rifiuta invece quelli acidi.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali da noi adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson al 7° giorno di incubazione a 35°C : 6 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla figura n. 20.

Osservazione macroscopica: all'8° giorno di sviluppo la patina appare rossa, abbondante, slargata, a margini talora netti, talaltra frastagliati su tutti i substrati nutritivi ad eccezione che su *agar Lochhead C*, su cui si osserva una patina piuttosto scarsa, jalina, con coloniette isolate di color rosso. Nei substrati liquidi, ad eccezione del *brodo sale sec. Anderson* in cui non si osserva intorbidamento della massa liquida, negli altri invece il brodo è torbido con deposito più o meno abbondante verso il fondo, jalino-roseo e senza sviluppo di velo superficiale. In *brodo patate sale* all'8° giorno e su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*, lo sviluppo è macroscopicamente scarso, anche al 17° giorno.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffinosio, mannite, glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, xilosio (v. tabella n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).

Produce ammoniaca (v. tabella n. 4).

Non produce indolo.

Non produce idrogeno solforato.

Non produce acidi.
Non sviluppa gas.
Riduce i nitrati a nitriti.
E' fortemente proteolitico (figura n. 12) ma non caseinolitico.

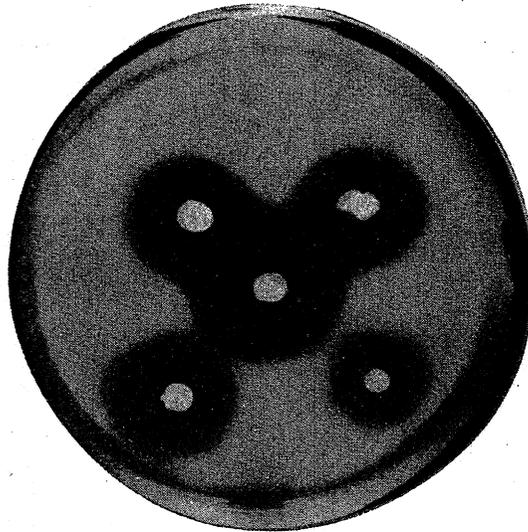


Fig. n. 12

E' lipolitico.

Amilolisi: assente.

Assimila molto bene gli amminoacidi adoperati (v. tabella n. 8).

Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vedere ella n. 10).

Il latte salato (brodo Lochhead « C ») è proteolitico e peptolitico; coagula infatti il latte, ridiscioglie il coagulo con separazione di siero, ed il coagulo si presenta leggermente fessurato.

Prove di reinfezione.

Sulla pelle salata fresca il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore so » (figura n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Il ceppo qui descritto ha alcuni caratteri in comune con *Micrococcus denitrificans* Robinson e Gibbons, come forma, grandezza, proprietà ge-

latinolitica, riduzione dei nitrati, ecc., ma a differenza di questi che è alotolerante, il nostro ceppo è invece alofilo obbligato, è lipolitico, è cromogeno, è mesofilo; ha pure alcuni caratteri che lo avvicinano a *Micrococcus morrhuae* Klebahn, ma se ne allontana, in particolare perchè le cellule del nostro ceppo hanno sempre un diametro inferiore, è più alofilo, non sviluppandosi al di sotto del 15% di NaCl, è lipolitico, riduce rapidamente i nitrati a nitriti. Per questi suoi caratteri specifici potremo considerarlo come una varietà nuova e pertanto proponiamo per esso il nome di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, var. *denitrolipolyticus*, n. var.

CEPPO N. 157

Halobacterium cutirubrum Lochhead, emend. Elazari - Volcani
var. *proteolyticum* n. var.

Caratteri morfologici generali: su tutti i substrati nutritivi si rinviene sempre una forma batterica che si conserva nell'invecchiamento; le forme sono isolate, raramente riunite in due o tre elementi e più particolarmente su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di sviluppo, appaiono sottili, lunghe,

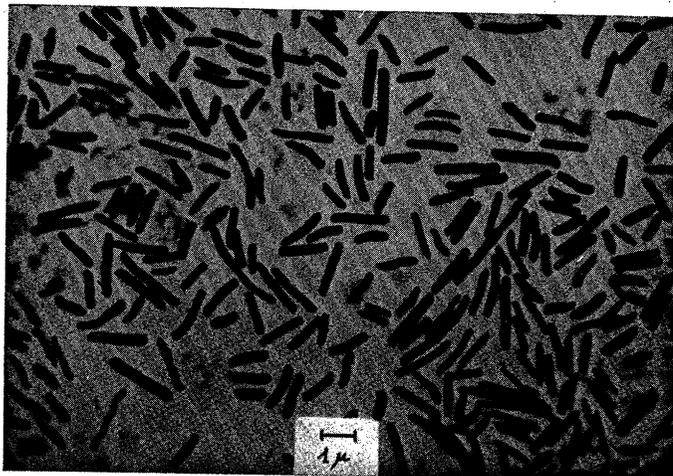


Fig. n. 13

ad estremi netti, con protoplasma addensato talvolta verso gli estremi, altre volte si nota un leggero ingrossamento ad un'estremità della forma a bacchetta, si rinvengono pure forme batteriche tozze, panciute, ad estremi ricurvi; misurano in media μ $2,54 \times 0,65$ (da μ $11,88 \times 0,90$ a μ $1,80 \times 0,45$ (fig. n. 13).

In *brodo sale sec. Anderson*, al 13° giorno di sviluppo, le forme batteriche isolate sono piuttosto rare, mentre invece sono numerose quelle riunite in catena, misurano in media μ $4,80 \times 0,77$ (da μ $11,47 \times 1,12$ a μ $2,25 \times 0,67$).

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 19,27 di O₂/lt.).
Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec. Anderson.

Termoresistente a 70°C per 10' (v. tabella n. 5).

Optimum di pH = 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza : 6,45 - 8,0 (si veda anche la tabella n. 2).

Alotollerante. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 6-32% (tabella n. 3).

Optimum di temperatura: 37-40°C.

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici di anilina, rifiuta invece quelli acidi.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali da noi adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia su piastra di agar sale sec. Anderson al 7° giorno di incubazione a 35°C : 7 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla fig. n. 20.

Osservazione macroscopica: all'8° giorno di sviluppo, la patina appare jalina con sfumature rosee, a margini netti, umida, scolante verso il fondo, su *agar sale sec. Anderson*, *patata salata*, *agar pelle sale*, *agar Lochhead B*, *agar Lochhead C*, *agar pelle mannite caseina*, *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*. Assume invece, una colorazione rossa, mucosa su *agar patate sale*; nei substrati liquidi, invece, si ha un leggero intorbidamento e formazione di scarso deposito jalino al fondo e talora un sottile velo superficiale risalente lungo i bordi del tubo; in *brodo pelle mannite caseina* e in *brodo pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato* si ha solo intorbidamento del liquido; in *brodo e agar sintetico arricchito di Anderson* lo sviluppo, anche al 17° giorno, è poco appariscente.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffiniosio, mannite, glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, ilosio (v. tabella n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).
Produce ammoniaca (v. tabella n. 4).
Non produce indolo.
Non produce idrogeno solforato.
Non produce acidi.
Non sviluppa gas.
Riduce lievemente i nitrati a nitriti.
E' proteolitico (fig. n. 14) ma non caseinolitico.



Fig. n. 14

Non è lipolitico.

Amilolisi: positiva ma poco intensa.

Assimila moltissimo gli amminoacidi adoperati (v. tabella n. 8).

Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vedere tabella n. 10).

In latte salato (brodo Lochhead « C ») è proteolitico e peptolitico: coagula il latte, ridiscioglie il coagulo con separazione di siero torbido; il coagulo è leggermente fessurato.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (figura n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Questo ceppo ha diversi caratteri in comune con *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari-Volcani. Si differenzia però in quanto non presenta polimorfismo (mancano infatti cellule sferiche); è immobile, è termoresistente (a 70°C per 10'); riduce lievemente i nitrati a nitriti; si sviluppa bene nei substrati liquidi, purchè abbiano una concentrazione in NaCl non inferiore al 10%. Per questi caratteri fisio-biochimici differenti, riteniamo che possa considerarsi una nuova varietà della specie di Lochhead e pertanto proponiamo il nome di *Halobacterium cutirubrum*, var. *proteolyticum*, n. var.

CEPPO N. 185

Halobacterium Simoncinii n. sp.

Caratteri morfologici generali: si rinvencono su tutti i substrati nutritivi forme batteriche quasi sempre isolate, talvolta riunite in due o tre elementi, ad estremi ricurvi, piuttosto tozze, quasi sempre leggermente ingrossate, ad un estremo; su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di sviluppo, misura in media $\mu 2,0 \times 0,63$ (da $\mu 4,95 \times 0,67$ a $\mu 1,20 \times 0,45$ (figura n. 15).

In *brodo sale sec. Anderson*, al 13° giorno di sviluppo, le forme batteriche appaiono spesso vuote all'interno e sono riunite talora a formare delle lunghe catene, misurano in media $\mu 3,74 \times 0,75$ (da $\mu 9,22 \times 1,12$ a $\mu 2,25 \times 0,67$).

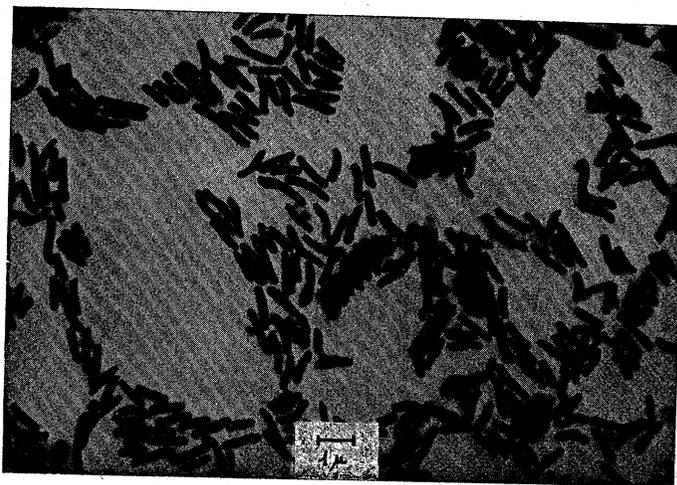


Fig. n. 15

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O₂/lt.).
Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec. Anderson.

Termoresistente a 70°C per 10' (v. tabella n. 5).

Optimum di pH: 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza :
pH = 6,0 - 8,0 (si veda anche la tabella n. 2).

Alofilo obbligato. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 10-32% (vedere tabella n. 3).

Optimum di temperatura: 33 - 37°C.

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici, rifiuta invece quelli acidi di anilina.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali da noi adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson al 7° giorno d'incubazione a 35°C : 9 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla figura n. 20.

Osservazione macroscopica: la patina all'8° giorno di sviluppo, appare rosea o rossa su *agar pelle sale*, *agar Lochhead B*, *agar patate sale*, *agar pelle mannite caseina*, *agar pelle sale riso di Clayton e Gibbs modificato*; è mucosa, rilevata, a margini netti, e lascia quasi sempre un deposito rosso nel liquido di condensazione. La patina appare jalina con riflessi rosei su *agar sale sec. Anderson* e *agar Lochhead C*; assume un colore rosso-bruno su *patata salata*. Nei substrati liquidi dà intorbidamento e deposito efflorescente jalino-roseo al fondo, ad eccezione del *brodo Lochhead B*, del *brodo pelle mannite caseina* in cui si ha solo intorbidamento; non si sviluppa su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffiniosio, mannite, glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, xilosio (v. tabella n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).

Produce ammoniaca (tabella n. 4).

Non produce indolo.
Non produce idrogeno solforato.
Non produce acidi.
Non sviluppa gas.
Riduce leggermente i nitrati a nitriti.
E' lipolitico.



Fig. n. 16

E' proteolitico (fig. n. 16) e caseinolitico.

Amilolisi: assente.

Assimila moltissimo gli amminoacidi adoperati (v. tabella n. 8).

Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vedere tabella n. 10).

In latte salato (brodo Lochhead « C ») è proteolitico e peptolitico: coagula il latte, ridiscioglie il coagulo, il coagulo è flaccido con separazione di acqua bianco-rosa.

Prove di reinfezione.

Su pelle fresca salata, il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore osso » (fig. n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Questo ceppo ora descritto, non ha per quel che ci consta, caratteri identici con specie già note e siccome, fra l'altro è termoresistente, è lipolitico, è proteolitico e caseinolitico, riduce leggermente i nitrati, assimila in maniera marcata gli amminoacidi, lo riteniamo una specie nuova e per essa proponiamo il nome di *Halobacterium Simoncini* n. sp., dedicandolo al Prof. Enrico Simoncini, Direttore della Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti di Napoli.

CEPPO N. 202.

Halobacterium Simoncini n. sp.,
var. *neapolitanum* n. var.

Caratteri morfologici generali: la forma batterica di lunghezza media è tipica in questo ceppo e si conserva anche nell'invecchiamento. Le cellule appaiono quasi sempre isolate su tutti i substrati nutritivi, raramente riunite

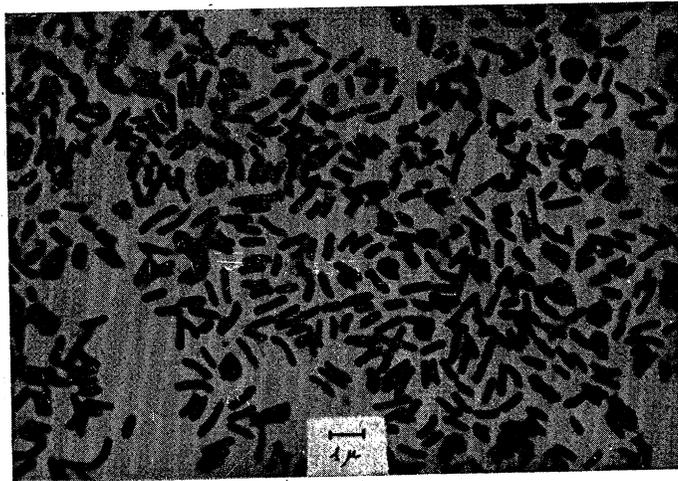


Fig. n. 17

in due o tre elementi, e più precisamente su *agar sale sec. Anderson*, al 19° giorno di sviluppo, sono piuttosto tozze, hanno estremi arrotondati, misurano in media $\mu 1,30 \times 0,66$ (da $\mu 4,62 \times 0,90$ a $\mu 0,95 \times 0,45$) (figura n. 17). In *brodo sale sec. Anderson* al 13° giorno di sviluppo, si rinvengono talora forme più allungate rispetto a quelle osservabili sul relativo substrato agarizzato; misurano in media $\mu 2,78 \times 0,75$ (da $\mu 8,77 \times 0,90$ a $\mu 1,02 \times 0,67$).

Caratteri fisiologici.

Aerobico (ma si sviluppa anche ad una tensione di mg 13,61 di O₂/lt.).

Immobile.

Gram-negativo al 10° e al 45° giorno di sviluppo su agar sale sec.

Anderson.

Termoresistente a 70°C per 10' (v. tabella n. 5).

Optimum di pH: 7,5 (al 4° giorno di sviluppo); limiti di tolleranza: pH = 6,0 - 8,0 (si veda anche la tabella n. 2).

Alofilo obbligato. Limiti di salinità (espressi in NaCl): 15-32% (tab. n. 3).

Optimum di temperatura: 33 - 37°C.

Optimum di umidità: 65%.

Assume bene i colori basici di anilina, rifiuta invece quelli acidi.

Colorazione dei corpuscoli metacromatici: negativa.

Risultati citochimici: nessuna influenza viene esercitata dagli acidi e dagli alcali adoperati.

Caratteri colturali.

Diametro della macrocolonia in piastra di agar sale sec. Anderson al 7° giorno d'incubazione a 35°C : 6,5 mm.

Per quanto riguarda la curva di crescita si rimanda alla figura n. 20.

Osservazione macroscopica: la patina appare in genere intorno al 10° giorno di sviluppo jalino-rosea fino a rosa marcato, a margini spesso ondulati o molto frastagliati, umida, talora scolante verso il fondo, talaltra presentando isolette più fortemente colorate ed eterogeneamente distribuite su tutta la superficie dell'agar: caratteri questi, particolarmente evidenti, su *agar sale sec. Anderson, agar pelle sale, agar Lochhead B, agar pelle mannite caseina, agar pelle sale di Clayton e Gibbs modificato*. La patina è invece jalina e scarsissima anche al 10° giorno di sviluppo su *agar Lochhead C*. Nei substrati liquidi il brodo è quasi sempre torbido; il velo superficiale è assente e poco marcato è il deposito roseo al fondo. Non si è avuto sviluppo, fino al 15° giorno, su *agar e brodo patate sale* e su *agar e brodo sintetico arricchito di Anderson*.

Caratteri biochimici.

Assimila ma non fermenta: saccarosio, raffiniosio, mannite, glicerina.

Non assimila: glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, lattosio, arabinosio, xilosio (v. tabella n. 9).

Solubilità del pigmento (v. tabella n. 6).
Produce ammoniaca (v. tabella n. 4).
Non produce indolo.
Non produce idrogeno solforato.
Non produce acidi.
Non sviluppa gas.
Riduce i nitrati a nitriti.
E' proteolitico (fig. n. 18) e caseinolitico.



Fig. n. 18

E' lipolitico.
Amilolisi: assente.
Assimila moltissimo gli amminoacidi adoperati (v. tabella n. 8).
Assimila le vitamine: B₁, B₂, B₆, C, D₂, A, E; non assimila la K₁ (vedere tabella n. 10).
In latte salato (brodo Lochhead « C ») è proteolitico.

Prove di reinfezione.

Su pelle salata fresca, il ceppo riproduce l'alterazione detta di « calore rosso » (figura n. 19).

Considerazioni tassonomiche.

Questo ceppo ha diversi caratteri in comune col nostro ceppo n. 185, ritenuto una specie nuova. Si differenzia, però, per la grandezza delle cellule, per una più marcata alofilia (non si sviluppa al disotto del 15% di NaCl, rispetto al ceppo n. 185 che si sviluppa invece anche al 10%); è fortemente riducente i nitrati (mentre il n. 185 lo è solo lievemente); ha una curva di crescita più accentuata rispetto al n. 185; è soltanto proteolitico nel latte e non peptolitico a differenza del n. 185 che è invece anche peptolitico; produce una minore quantità di ammoniaca; il pigmento presenta una diversa solubilità, ecc. Pertanto, riteniamo che possa considerarsi una varietà del precedente e quindi proponiamo il nome di *Halobacterium Simoncinii* n. sp., var. *neapolitanum* n. var., considerando che il ceppo è stato studiato da noi per la prima volta nella città di Napoli.

TABELLA N. 1

Caratteristiche e Costituenti	ANALISI CHIMICHE SULLE PELLI ADOPERATE					
	Pelli bovine nostrane salate (*)			Pelli bovine Packers salate		
	A	B	C	A	B	C
Salatura	in vasca	in vasca	fuori vasca	a secco	a secco	a secco
Peso salato Kg.	13,8	14,5	15,5	16,0	19,0	10,4
Umidità	45,23	45,54	44,31	33,98	34,78	37,39
Cloruro	14,21	16,05	14,95	12,61	16,83	15,28
Sostanza dermica	29,16	29,88	29,49	31,92	29,13	32,19
Sostanze grasse	0,87	0,69	0,77	13,99	13,83	6,07
Azoto solubile	0,68	0,60	0,72	1,10	1,21	0,98
Ceneri	0,30	0,42	0,43	0,58	2,10	1,22
Sostanze indeterminate (pelo, sterco, ecc.)	9,55	6,82	9,33	5,81	4,12	6,87
pH lavabile (20‰)	6,01	6,25	5,95	5,75	6,80	6,00

(*) Le determinazioni sono state eseguite dopo tre mesi dalla salatura.

TABELLA N. 2

INFLUENZA DELLA REAZIONE DEL MEZZO SULLO SVILUPPO DEI CEPPI									
Ceppo	pH 4,65	pH 5,20	pH 5,50	pH 6	pH 6,45	pH 7	pH 7,50	pH 8	
13	—	—	—	++	++	++	+++	++	
14	—	—	—	±	++	++	+++	++	
17	—	—	—	+	++	++	++	++	
81	—	—	—	—	+	++	+++	++	
82	—	—	—	—	++	++	++	+	
105	—	—	—	—	+	++	++	+	
136	—	—	—	—	++	++	+++	+	
150	—	—	—	—	±	+	++	+	
157	—	—	—	—	+	+	+	+	
185	—	—	—	±	±	+	++	++	
202	—	—	—	±	±	+	++	++	

— : assente; ± : scarso; + : mediocre; ++ : buono; +++ : ottimo.

Nota : Determinazioni eseguite al 10° giorno su agar sale sec. Anderson, tamponato sec. McIlvaine (26).

TABELLA N. 3

INFLUENZA DELLE CONCENTRAZIONI DI NaCl SULLO SVILUPPO DEI CEPPI										
Ceppo	2%	4%	6%	8%	10%	15%	20%	27,5%	32%	Osservazioni
13	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	aloflo obbligato
14	—	—	++	++	++	++	++	+++	+++	alo-tollerante
17	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	aloflo obbligato
81	—	—	—	—	—	—	+	+++	+++	aloflo obbligato
82	—	—	+	+	+	+	+	+++	+++	alo-tollerante
105	—	—	—	—	—	—	±	+++	+++	aloflo obbligato
136	—	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	alo-tollerante
150	—	—	—	—	—	+	+++	+++	+	aloflo obbligato
157	—	—	±	±	+	+++	+++	+++	+++	alo-tollerante
185	—	—	—	—	±	+	+++	+++	+++	aloflo obbligato
202	—	—	—	—	—	±	+++	+++	+++	aloflo obbligato

— : assenza di sviluppo ; ± : sviluppo scarso ; + : mediocre ; ++ : discreto ; +++ : buono ; ++++ : ottimo.
 Nota : determinazioni eseguite al 10° giorno su agar sale sec. Anderson.

TABELLA N. 6

SOLUBILITA' DEL PIGMENTO													
Ceppo	Acqua	Alc. etilico	Alc. metilico	Etere etilico	Etere petrolio	Piridina	Xilolo	Benzolo	Acetone	Alc. butilico	Cloruro di metilene	Cloroformio	
13	— —	+	— —	— —	— —	+	— —	— —	+	± ±	+	— —	
14	— —	— —	— —	— —	— —	+	— —	— —	+	— —	— —	— —	
17	+	++	+	— ±	— —	+++	— —	— —	+++	++	— —	— —	
81	± ±	+	± ±	+	— —	++	— —	— —	++	+	— —	— —	
82	— —	± ±	— —	± ±	— —	— —	— —	— —	+	+	— ±	— —	
105	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	+	+	— —	— —	
136	— —	+	++	++	— ±	+	— —	— —	+	— —	— —	— —	
150	+	+	+	± ++	— —	+	— —	— —	++	+	— —	+	
157	— ±	++	± +	+	— —	+++	— —	— —	++	+	— —	— —	
185	+	+++	++	+	— ±	++	— —	— —	+++	+++	+++	+	
202	+	+++	± +	+	— ±	+++	— —	— —	+++	— ±	± ±	+	

Nota: +; ++; +++ = solubilità positiva in ordine crescente; ±: scarsa; —: negativa.
La doppia serie dei risultati sta ad indicare sulla prima linea = prove a freddo; sulla seconda linea = prove a caldo.

ASSIMILAZIONE DEGLI IDRATI DI CARBONIO E DEGLI ALCOLI SUPERIORI

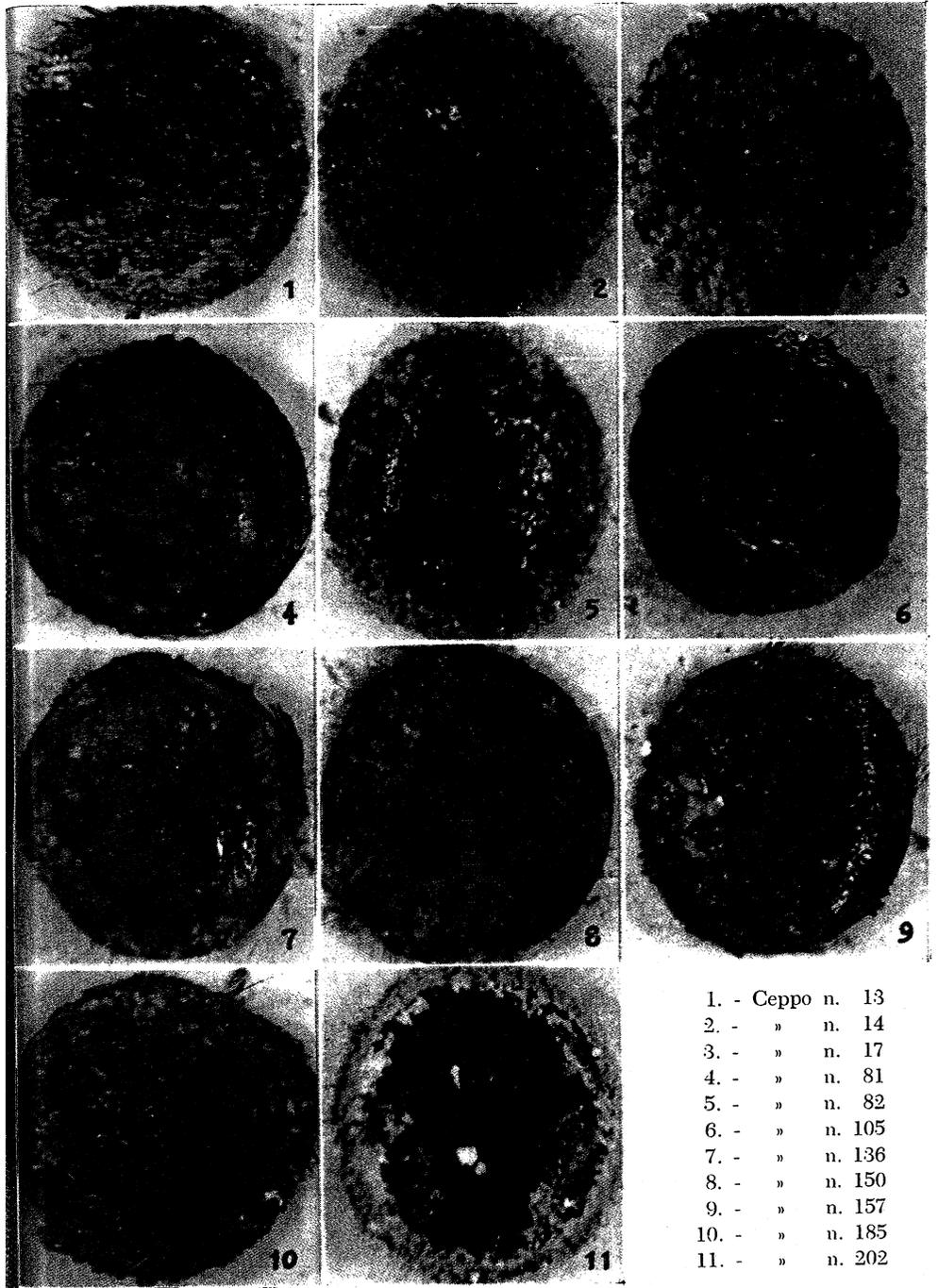
Ceppo	Glucosio	Fruttosio	Galattosio	Maltosio	Saccarosio	Lattosio	Raffinosio	Arabinosio	Xilosio	Glicerina	Mannite
13	-	-	-	-	++;i	-	++;i	-	-	++;i	++;i
14	+++;i	-	-	-	++;i	-	++;i	-	-	+++;i	+++;i
17	-	-	-	++;i	++;i	++;i	++;i	-	-	++;i	++;i
81	-	-	+++;i	-	++;i	-	++;i	+++;i	++;i	++;i	++;i
82	-	-	-	-	++;i	-	++;i	-	-	++;i	++;i
105	-	-	-	-	++;i	-	++;i	-	-	+++;i	+++;i
136	-	-	-	-	++;i	-	++;i	-	-	++;i	++;i
150	-	-	-	-	++;i	-	++;i	-	-	+++;i	+++;i
157	-	-	-	-	+++;i	-	+++;i	-	-	++;i	++;i
185	-	-	-	-	++;i	-	++;i	-	-	+++;i	+++;i
202	-	-	-	-	+++;i	-	+++;i	-	-	+++;i	+++;i

Nota: i = intorbidamento; f = fermentazione; g = sviluppo di gas.

TABELLA N. 10

DETERMINAZIONI SPETTROFOTOMETRICHE
SULLA ASSIMILAZIONE DELLE VITAMINE IN BRODO-SALE, SEC. ANDERSON

A		B ₁		B ₂		B ₆		C		D ₂		E		K ₁		« Vi-Dalin »		
V i t a m i n e																		
T r a s m i t t a n z a a 6 0 5 mμ																		
C e p p o	Tempo 0	Alla 288 ^a ora																
	13	98,8	19,8	98,7	19,8	98,2	36,6	98,2	40,1	99,8	27,3	100,0	48,0	87,6	35,8	99,2	99,0	89,5
14	95,5	30,0	98,5	30,5	100,0	36,3	100,0	27,9	97,6	31,4	100,1	34,4	92,4	32,1	97,6	97,5	93,4	31,4
17	96,2	25,0	98,0	25,0	97,0	36,6	98,7	21,5	94,3	19,6	99,7	43,2	98,2	27,0	94,9	24,6	100,0	28,5
81	99,2	10,5	98,2	14,9	100,2	31,6	97,2	19,7	99,1	27,4	99,7	23,1	95,1	29,9	98,1	98,0	86,6	27,4
82	99,5	40,5	98,9	34,2	100,5	50,2	99,0	48,6	100,0	25,3	99,4	39,5	87,6	27,9	95,9	95,7	93,2	19,8
105	97,2	19,8	98,5	18,2	99,0	28,9	98,0	24,3	92,7	20,4	98,2	42,7	100,0	36,8	92,7	92,7	98,1	31,4
136	99,1	37,8	97,0	36,8	96,2	49,2	98,3	39,2	98,5	27,2	95,9	28,7	89,1	63,4	99,9	98,9	100,0	41,1
150	98,5	23,8	100,0	22,2	100,0	39,5	99,2	40,1	94,7	19,8	97,7	29,3	85,4	28,1	98,7	98,7	99,4	23,6
157	98,0	34,5	96,8	31,8	100,3	42,5	96,4	42,1	91,8	27,6	98,1	25,4	100,0	31,0	99,4	99,2	98,1	20,8
185	98,7	20,0	99,0	13,8	97,5	21,0	97,2	17,5	97,6	19,5	100,0	43,2	89,8	33,1	95,7	96,0	97,6	27,9
202	99,6	19,0	96,9	16,2	94,8	21,2	98,2	20,4	96,9	17,3	91,9	24,6	89,5	24,0	96,3	96,2	89,5	22,1



- 1. - Ceppo n. 13
- 2. - » n. 14
- 3. - » n. 17
- 4. - » n. 81
- 5. - » n. 82
- 6. - » n. 105
- 7. - » n. 136
- 8. - » n. 150
- 9. - » n. 157
- 10. - » n. 185
- 11. - » n. 202

Fig. n. 19

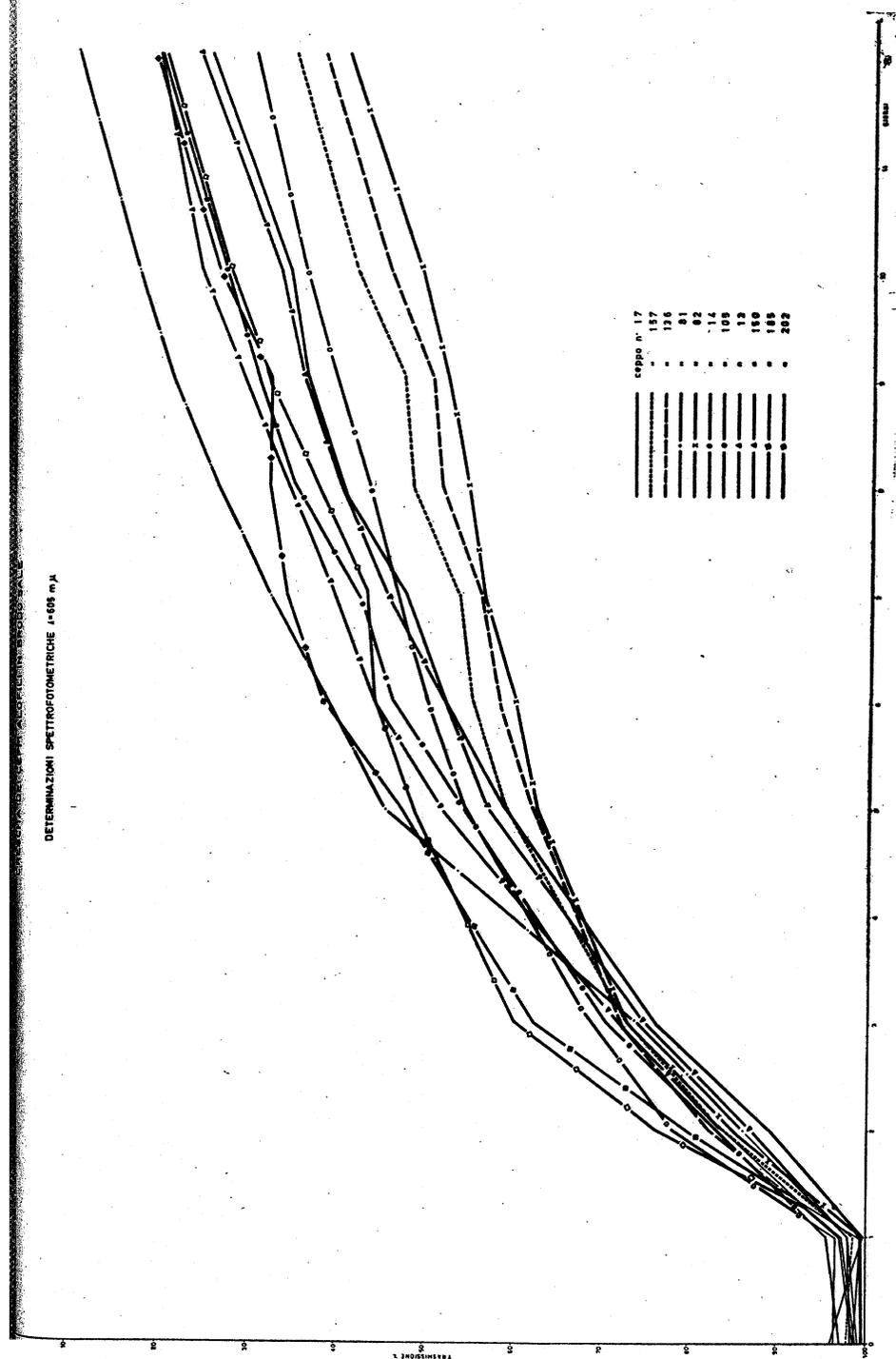


Fig. n. 20

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati delle indagini riferite nel presente lavoro, in aggiunta a quelli già resi noti in precedenza (14), ci consentono di fare alcune considerazioni di carattere generale sull'alterazione nota come « calore rosso » delle pelli salate e di trarre qualche utile conclusione.

Nell'affrontare il problema, vasto e complesso, delle cause predisponenti e concomitanti al verificarsi del « calore rosso » sulle pelli bovine salate in genere, e su quelle Packers in particolare, potemmo osservare (14) che numerosi erano i fattori che concorrevano all'insorgere ed allo estendersi della alterazione.

In primo luogo accertammo che il « calore rosso » è da ritenersi di origine microbica.

Nel contempo, allora supponemmo ed oggi possiamo convalidare e precisare che non ad un unico germe è da attribuire il danno, bensì ad un'estesa microflora alofila obbligata e specifica, coadiuvata, nella estrinsecazione del proprio metabolismo, da una microflora epifittica naturale, concomitante, solo apparentemente aspecifica, spesso e, quel che più conta, alotollerante.

Altre condizioni predisponenti all'insorgere del « calore rosso » furono ricercate nell'ambito dell'habitat naturale, sia delle pelli (in base alla loro struttura istologica, alla loro composizione chimica, alla giacenza sul terreno dopo la mattazione degli animali, alla esposizione o alla sottrazione delle stesse all'influenza dei fattori dinamici dell'ambiente, ecc.), sia dei mezzi e metodi normalmente impiegati per la loro conservazione.

Le pelli, in quanto tali, costituiscono un substrato ideale per l'impiantarsi di una eterogenea microflora e microfauna e, pertanto, possono subire le più svariate alterazioni [dallo « abbattimento » (sinonimo di afflosciamento) alla perdita di una notevole quantità di acqua; dall'ossidazione o riduzione dei propri costituenti chimici all'indebolimento della struttura fisica ed istologica, alla putrefazione, alla distruzione completa]; ma altri fattori, come i mezzi che normalmente vengono usati per permetterne la conservazione, talora sono la causa dell'accentuazione di determinati fenomeni alterativi. Il sale, ad esempio, è uno di questi fattori; ma ancora, possiamo indicare l'umidità dell'ambiente, l'esposizione all'aria atmosferica, la protratta conservazione in frigorifero delle pelli e quindi la ritardata concia, e così via, tra i fattori concomitanti all'alterazione e che, purtroppo, non sempre è facile dominare, sostituire od eliminare.

Per rimanere nell'ambito della causa microbiologica come fattore di comparsa del « calore rosso », confermiamo che sono i germi alofili obbligati cromogeni a cui si deve il fenomeno alterativo.

Questi germi hanno esigenze ambientali, nella più vasta accezione della espressione, precise e particolari e la loro caratterizzazione morfo-fisio-biologica richiede l'impiego di tecniche specifiche che spessissimo si allontanano da quelle comunemente utilizzate per gli altri germi.

Si nota, infatti, tra l'altro che per lo studio, ad esempio, della loro morfologia non è possibile sospendere la patina microbica di questi alofili obbligati in acqua per l'allestimento, come solito, dei preparati microscopici, senza che si abbia l'involuzione e quasi subito lo scoppio della cellula microbica per rottura della parete cellulare a meno che non si impieghi acqua col 20-25% di NaCl; e, ancora, non si prestano i comuni metodi di essiccazione e fissazione alla fiamma, bensì sono richieste determinate sostanze chimiche per procedere nelle operazioni. Altrettanto dicasi circa i metodi di colorazione per cui quelli normali, mal si adattano ad evidenziare gli alofili cromogeni.

A riguardo della impossibilità di poter impiegare acqua per sospendere i germi, facciamo notare come ciò potrebbe essere giustificato con la stretta alofilia dei germi, solo però se dall'analisi dei costituenti le cellule stesse risultasse in esse un accumulo di NaCl, il che invece non si verifica: la percentuale, infatti, di NaCl nel mezzo di coltura rimane, come ripetutamente abbiamo constatato dopo le necessarie determinazioni microchimiche, invariata, sicchè, allora è da supporre che il sale, non rappresentando un fattore di crescita nè un costituente alimentare per il germe, debba esplicare soltanto una funzione fisica come regolatore della « pressione osmotica » o della « tensione superficiale » nel mezzo ambiente.

Indagini a tal riguardo sono attualmente in svolgimento per convalidare o meno la supposizione dianzi formulata, sostituendo, ad esempio, il cloruro sodico con altra sostanza possedente la stessa isotonia del NaCl.

Anche per quanto concerne la produzione del pigmento e l'accentuazione del relativo colore si affacciano ipotesi e supposizioni, in base ai risultati finora raccolti, che dovranno essere corroborate da ulteriori indagini.

Ricordiamo, infatti, che per ora noi riteniamo che l'attenuazione o la perdita della pigmentazione in seguito alla prolungata coltivazione dei germi su substrati artificiali di laboratorio non segua le leggi generali che regolano il processo in parola al pari di quanto si osserva per gli altri germi cromogeni.

Così la trasformazione in leucoprodotto dei pigmenti di taluni dei nostri ceppi [trasformazione che già nella nostra prima nota (14)] fu supposta essere legata alla particolare formazione di sali di ossonio, anche se necessariamente richiede una ulteriore sperimentazione, trova finora la più probabile conferma, tenendo conto che il meccanismo della loro formazione può essere legato al fatto che l'atomo di ossigeno è tetravalente (come ad esempio nel cloridrato di dimetilpirone) e che, essendo l'ossigeno degli eteri, degli alcoli,

dei chetoni, ecc., insaturo, è possibile che esso addizioni acidi o sali metallici: nel nostro caso NaCl.

E passando ora a considerare l'attività dei ceppi alofili da noi isolati, ricordiamo come è stata accertata per essi, oltre ad un'attività proteolitica (già messa in evidenza anche da precedenti ricercatori per altri germi consimili), un'attività lipolitica per alcuni di essi, giammai osservata, oltre ad una spiccata termoresistenza.

Questi fatti, riteniamo, abbiano interesse oltrechè scientifico anche pratico perchè consentiranno di stabilire fino a qual punto non solo le proteine, ma anche e soprattutto i costituenti lipidici delle pelli bovine Packers subiscano degradazione. E tutto ciò al fine ultimo di poter orientare la scelta dei mezzi o delle metodiche atte ad impedire o ad eliminare l'alterazione di « calore rosso ».

Dopo queste brevi considerazioni, in base ai risultati fin qui acquisiti, possiamo concludere che :

1) Su un totale di 236 ceppi microbici (fra schizomiceti, actinomiceti ed eumiceti), alotolleranti, alofili obbligati o indifferenti, cromogeni oppure no, isolati da pelli bovine salate (Packers americane), 11 sono responsabili della alterazione nota come « calore rosso ».

Sono tutti schizomiceti alofili obbligati od alotolleranti; di essi, 9 sono cromogeni (a pigmento rosso più o meno intenso) e 2 sono jalini.

2) Dopo aver studiato i loro caratteri morfo-fisiologici ed il loro metabolismo biochimico, 2 sono da considerare specie nuove; gli altri sono da riportare a germi già descritti o sono da ritenere loro varietà.

Più particolarmente :

Il ceppo n. 13 è identico ad *Halobacterium halobium* Petter, emend. Elazari - Volcani ;

il ceppo n. 14 è da considerarsi una varietà di *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani, per la quale noi proponiamo il nome di *thermophilum* n. var., in quanto possiede, tra l'altro, una spiccata termoresistenza ;

il ceppo n. 17 è da rapportarsi a *Sarcina litoralis* Poulsen ;

il ceppo n. 81 deve ritenersi una specie nuova e pertanto noi proponiamo il nome di *Micrococcus Riccardi* n. sp., dedicandola al nostro Maestro, Prof. Salvatore Riccardi ;

il ceppo n. 82 è identico ad *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani ;

il ceppo n. 105 riteniamo debba considerarsi una varietà di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, per la quale proponiamo il nome di *lipolyticus* n. var., in quanto, fra l'altro, possiede una chiara attività lipolitica ;

il ceppo n. 136 è da rapportarsi ad *Halobacterium trapanicum* Petter, emend. Elazari - Volcani ;

il ceppo n. 150, riteniamo sia una varietà di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, per la quale, in grazia di una notevole attività denitrificante e lipolitica, proponiamo il nome di *denitrolipolyticus* n. var. ;

il ceppo n. 157 è da considerarsi una varietà di *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani, per la quale, avendo accertato fra l'altro una manifesta attività proteolitica, proponiamo il nome di *proteolyticum* n. var. ;

il ceppo n. 185 deve ritenersi una specie nuova e pertanto proponiamo per essa il nome di *Halobacterium Simoncini* n. sp., dedicandola al Prof. Enrico Simoncini ;

il ceppo n. 202 è una varietà del predetto *Halobacterium Simoncini* n. sp., per la quale proponiamo il nome di *neapolitanum* n. var., essendo stata isolata e descritta da noi per la prima volta a Napoli.

3) Tutti i germi da noi descritti sono da considerarsi agenti specifici del « calore rosso », in quanto hanno sempre dato risultato positivo nelle prove di reinfezione su pelli bovine sane e salate.

4) Tutti i nostri germi manifestano più intensamente le loro attività metaboliche in ambiente a concentrazione di pH tra 6,5 e 8,0. Al disotto di pH = 6,0 ogni attività si arresta.

5) La concentrazione ottimale di NaCl si aggira, per gli alofili obbligati, intorno al 27,5%, con un minimo intorno al 20% ed un massimo del 32%. Per gli alotolleranti (ceppi nn. 14, 82, 136, e 157) il minimum si aggira sul 6%.

6) La maggiore attività proteolitica è posseduta dal ceppo n. 185 con una produzione di NH_3 di 107 γ /cc rispetto alla prova in bianco di 6 γ /cc.

7) I ceppi nn. 13, 14, 81, 157, 185 e 202 sono termoresistenti; di essi quello che ha manifestato più marcatamente questa proprietà è il n. 81 che resiste al riscaldamento fino a 80°C per 10 minuti.

8) Il pigmento dei nostri ceppi, quando è presente, può considerarsi, allo stato attuale delle indagini, come appartenente al gruppo dei carotenoidi. Il colore va da un rosa pallido ad un rosso intenso; possiede una diversa solubilità nei solventi organici. Per taluni ceppi (nn. 17, 81, 136, 150, 157, 185 e 202) e per determinati solventi (etere etilico, alcool etilico, alcool me-

tilico), dopo un tempo variabile di contatto con il pigmento estratto dai rispettivi germi, il pigmento stesso si trasforma in leucoprodotto.

9) Nessuna influenza viene esercitata sui nostri germi dalle sostanze vitaminiche aggiunte ai terreni di coltura; nè si manifestano reazioni citochimiche in seguito all'impiego di determinati alcali ed acidi.

10) La caratterizzazione morfo-fisiologica dei germi isolati e la coltura dei medesimi, richiedono mezzi e substrati particolari, come indicato nel testo.

11) Il NaCl aggiunto al mezzo, sembra allo stato attuale, che non abbia valore alimentare nè costituisca fattore di crescita per i germi descritti, ma piuttosto possa essere considerato come un regolatore della pressione osmotica cellulare o della tensione superficiale del mezzo.

*Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli
e delle Materie Concianti. Napoli - Torino.*

Direttore: Prof. Dott. ENRICO SIMONCINI

*Istituto di Microbiologia Agraria e
Tecnica dell'Università di Napoli.*

Direttore: Prof. Dott. SALVATORE RICCARDO

R I A S S U N T O

Sono stati isolati da pelli Packers americane affette da « calore rosso » 236 ceppi microbici (fra schizomiceti, actinomiceti ed eumiceti), sia alotolleranti, sia alofili obbligati, nonchè indifferenti, cromogeni o non. Essi, dopo una estesa indagine sui loro caratteri morfo-fisiologici, colturali e biochimici, sono stati riuniti in 11 agenti microbici specifici dell'alterazione.

E precisamente :

Il ceppo n. 13 è da ritenersi identico ad *Halobacterium halobium* Petter emend. Elazari - Volcani ;

il ceppo n. 14 è da considerarsi una varietà di *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani, per cui abbiamo proposto il nome di *thermophilum* n. var. ;

il ceppo n. 17 è da riportarsi a *Sarcina litoralis* Poulsen ;

il ceppo n. 81 è una specie nuova per la quale abbiamo proposto il nome di *Micrococcus Riccardi* n. sp. ;

il ceppo n. 82 è da attribuirsi ad *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani ;

il ceppo n. 105 è stato ritenuto una varietà di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, per cui abbiamo proposto il nome di *lipolyticus* n. var. ;

il ceppo n. 136 è identico ad *Halobacterium trapanicum* Petter, emend. Elazari - Volcani ;

il ceppo n. 150 è stato considerato come una varietà di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, per la quale abbiamo proposto il nome di *denitrolipolyticus* n. var. ;

il ceppo n. 157 è da ritenersi una varietà di *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani; per essa abbiamo proposto il nome *proteolyticum* n. var. ;

il ceppo n. 185 è una nuova specie per la quale abbiamo proposto il nome di *Halobacterium Simoncinii* n. sp. ;

il ceppo n. 202 è da considerarsi una varietà di *Halobacterium Simoncinii* n. sp., per la quale abbiamo proposto il nome: *neapolitanum* n. var.

I predetti agenti microbici sono per la massima parte alofili obbligati e cromogeni; quattro soltanto fra essi sono alotolleranti e due sono jalini. Tutti però hanno esigenze particolari per lo sviluppo e richiedono metodiche speciali per evidenziare i loro caratteri morfo-fisiologici.

Sono tutti agenti specifici del « calore rosso ».

R É S U M É

On a isolé 236 souches de microbes halo-tolerants, halophile-obligés et indifférents, pigmentées ou non (parmi les Schizomycètes, les Actinomycètes et les Eumycètes), des peaux de boeuf Packer de provenience americaine, grévées de « rougissement ». Après avoir conduit un large étude sur leurs caractères morpho-phisyologiques, de cultivation et bio-chimiques, on a réuni ces germes en 11 microbes spécifiques de l'altération.

Et précisément :

On doit retenir la souche n. 13 identique à *Halobacterium halobium* Petter, emend. Elazari - Volcani ;

on doit retenir la souche n. 14 comme une variété de *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani, pour laquelle nous avons proposé le nom de *thermophilum* n. var. ;

on doit rapporter la souche n. 17 à *Sarcina litoralis* Poulsen ;

on doit retenir la souche n. 81 comme une espèce nouvelle pour laquelle nous avons proposé le nom de *Micrococcus Riccardi* n. sp. ;

on doit rapporter la souche n. 82 à *Halobacterium cutirubrum* Lochhead emend. Elazari - Volcani ;

la souche n. 105 a été considéré une variété de *Micrococcus morrhuae* Klebahn, pour laquelle nous avons proposé le nom di *lipolyticus* n. var. ;

la souche n. 136 est identique à *Halobacterium trapanicum* Petter, emend. Elazari - Volcani ;

on doit considérer la souche n. 150 comme une variété de *Micrococcus morrhuae* Klebahn, pour laquelle nous avons proposé le nom de *denitrolipolyticus* n. var. ;

la souche n. 157 doit être considéré une variété de *Halobacterium cutirubrum* Lochhead emend. Elazari - Volcani, pour laquelle nous avons proposé le nom *proteolyticum* n. var. ;

on doit retenir la souche n 185 comme une espèce nouvelle pour laquelle nous avons proposé le nom de *Halobacterium Simoncinii* n. sp. ;

la souche n. 202 est une variété de *Halobacterium Simoncinii* n. sp. pour laquelle nous avons proposé le nom *neapolitanum* n. var.

Les microbes susdits, sont presque tous alophiles obligés et pigmentés; seulement quatre parmi les susdits sont halo-tolerants et deux sont hyalins.

Tous les germes ont besoin de facteurs particuliers pour le développement; ils exigent des méthodiques spéciales pour mettre en évidence leurs caractères morpho-physiologiques.

Les germes sont spécifiques du « rougissement ».

S U M M A R Y

From American Packers bovine hides affected by « red heat » were isolated 236 microbial strains (belonging to Schizomycetes, Actinomycetes and Eumycetes), among which there were halotolerant, obligatory halophilous, indifferent, chromogenic and no-chromogenic strains.

After a thorough research on their morpho-physiological, cultural and biochemical characters, they were grouped into 11 microbial agents, which are specific for the alteration, i. e. :

The strain N. 13 must be considered identical to *Halobacterium halobium* Petter emend. Elazari - Volcani ;

The strain N. 14 must be considered a variety of *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani, for which we have proposed the name *thermophilum* n. var. ;

The strain N. 17 must be refereed to *Sarcina litoralis* Poulsen ;

The strain N. 81 is a new species, for which we have proposed the name *Micrococcus Riccardi* n. sp. ;

The strain N. 82 must be assigned to *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani ;

The strain N. 105 has been considered a variety of *Micrococcus morrhuae* Klebahn, for which we have proposed the name *lipolyticus* n. var. ;

The strain N. 136 is identical to *Halobacterium trapanicum* Petter, emend. Elazari - Volcani ;

The strain N. 150 has been considered a variety of *Micrococcus morrhuae* Klebahn, for which we have proposed the name *denitrolypoliticus* n. var ;

The strain N. 157 must be considered a variety of *Halobacterium cutirubrum* Lochhead emend. Elazari - Volcani, for which we have proposed the name *proteolyticum* n. var. ;

The strain N. 185 is a new species, for which we have proposed the name *Halobacterium Simoncinii* n. sp. ;

The strain N. 202 must be considered a variety of *Halobacterium Simoncinii* n. sp., for which we have proposed the name *neapolitanum* n. var. .

Most of these microbial agents are obligatory halophilous and chromogenic; only 4 are halo-tolerant and 2 hyalin. However, all of them show particular requirements for their growth and need special methods in order to make evident their morpho-physiological characters.

All are specific agents of the « red heat ».

Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus amerikanischen Ziegelrotverfärbten Packer-Häute hat man 236 Bakterienstämme (vor allem Schizomycetes, Actinomycetes und Eumycetes) isoliert, zu denen halotoleranten, obligat-halophilen und indifferenten, sowie chromogenen und nichtchromogenen Arten angehören.

Nach zweckmässigen Untersuchungen ihrer Wachstumsverhältnissen und ihrer allgemeinen morpho-physiologischen und biochemischen Charaktere, wurden die Mikroben zu 11 Specien zugeschrieben, bei denen blos specifischen Erreger des Rotwerdens zusammengefasst sind und nämlich :

- Stamm n. 13 soll mit *Halobacterium halobium* Petter, emend. Elazari-Volcani identisch sein.
- Stamm n. 14 ist wahrscheinlich zu eine varietas des *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani zuschreiben, wofür der Name *thermophilum* n. var. vorgeschlagen wurde.
- Stamm n. 17 soll *Sarcina litoralis* Poulsen sein.

- Stamm n. 81 soll eine neue Species sein für die der Name *Micrococcus Riccardi* n. sp. vorgeschlagen wurde.
- Stamm n. 82 soll *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari-Volcani sein.
- Stamm n. 105 ist eine varietas von *Micrococcus morrhuae* Klebahn geschätzt worden, wofür name *lipolyticus* n. var. vorgeschlagen wurde.
- Stamm n. 136 ist wahrscheinlich mit *Halobacterium trapanicum* Petter emend. Elazari - Volcani identisch.
- Stamm n. 150 ist eine varietas von *Micrococcus morrhuae* Klebahn, wofür der name *denitrolipolyticus* n. var. vorgeschlagen wurde.
- Stamm n. 157 ist zu eine varietas von *Halobacterium cutirubrum* Lochhead, emend. Elazari - Volcani zuschreiben; für sie ist der Name *proteolyticum* n. var. vorgeschlagen.
- Stamm n. 185 ist eine neue Species für die der Name *Halobacterium Simoncinii* n. sp. vorgeschlagen wurde.
- Stamm n. 202 ist eine varietas von *Halobacterium Simoncinii* geschätzt worden und für ist nun der Name *neapolitanum* n. var. vorgeschlagen.

Die vorgeschriebenen mikrobischen Agenzien sind hauptsächlich halophilen, obligaten und chromogenen; vier aus denen sind halotoleranten und zwei jalinen. Alle zeigen spezifischen Wachstumbedürfnisse und benötigen besonderen Arbeitsweise um igren morpho-physiologischen Charaktere hervorheben zu können.

B I B L I O G R A F I A

1. ALLGEIER R. I., PETERSON W. H., FRED E. B. — *Journ. Bact.*, vol. 17, 1929, p. 79, in SNELL F. D. e SNELL C. T. — *Colorimetric methods of analysis.*, vol. III, parte I, ed. Van Nostrand, New York, 1953, p. 307.
2. ANDERSON H. — The reddening of salted hides and fish. *Appl. Microbiol.*, vol. 2, 1954, p. 64.
3. BECKWITH T. D. — The bacteriological cause of the reddening of cod and other allied fish. *Zentr. f. Bakt.*, I, Abt., vol. 6, 1911, p. 351.
4. BONADUCE A., LONDRILLO A. — Una nuova metodica per la colorazione delle spore del « Bac. anthracis ». Nota preliminare. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, vol. 37, n. 2, 1961, p. 99.
5. BJERRUM J. — On the tendence of metal ions toxard complex formation. *Chem. Revs.*, vol. 46, 1950, p. 381.

6. BREED R. S., MURRAY E. G., SMITH N. R. — *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 7^a edizione, ed. Williams e Wilkins Comp., Baltimore, 1957.
7. BROWN H. J., GIBBONS N. E. — The effect of magnesium, potassium, and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. *Canadian Journ. Microbiol.*, vol. 1, 1955, p. 486.
8. BROWNE W. — Halophilic bacteria. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, vol. 19, 1922, p. 321.
9. CLAYTON W., GIBBS W. E. — Examination for halophilic microorganisms. *Analyst*, vol. 52, 1927, p. 395.
10. COURINGTON D. P., GOODWIN T. W. — A survey of the pigments of a number of chromogenic marine bacteria, with special reference to the carotenoids. *Journ. Bact.*, vol. 70, 1955, p. 568.
11. CUSTANCE H. M., HIGGINS M. — *Analyst*, vol. 74, 1949, p. 310 in SNELL F. D. e SNELL C. T. — *Colorimetric methods of analysis*, vol. III, parte I, ed. Van Nostrand, New York, 1953, p. 306.
12. FARHALLY A. H. — Factors influencing the growth and light production of luminous bacteria. *Jour. Cellular Comp. Physiol.*, vol. 36, 1950, p. 165.
13. FORMISANO M. — *Guida allo studio tecnico della microbiologia agraria ed industriale*. ed. EDA, Bologna, 1956.
14. FORMISANO M. — Ricerche sul « calore rosso » delle pelli salate. *Boll. Stazione Sper. Ind. Pelli e Mat. Concianti*, vol. 38, n. 1, 1962, p. 11.
15. FREUNDLICH H. — Ueber das Ausfällen Kolloidaler Lösungen durch Electrolyte. *Zeitr. physik. Chem.*, vol. 44, 1903, p. 129.
16. GOLIKOWA S. M. — Eine Gruppe von obligat halophilen Bakterien, gezüchtet in Substraten mit hohem NaCl-Gehalt. *Zentr. f. Bakt.*, II Abt., vol. 80, 1930, p. 35.
17. HILL S. E. — The penetration of luminous bacteria by the ammonium salts of the lower fatty acids. *Jour. Gen. Physiol.*, vol. 12, 1929, p. 863.
18. HOFMEISTER F. — Ueber Regelmässigkeiten in der eiweissfällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, vol. 24, 1888, p. 247.
19. JOHNSON F. H., GRAY D. H. — Nuclei and large bodies of luminous bacteria in relation to salt concentration, osmotic pressure, temperature, and urethane. *Jour. Bact.*, vol. 58, 1949, p. 675.
20. LEHNINGER A. L. — Role of metal ions in enzyme system. *Physiolog. Revs.*, vol. 30, 1950, p. 393.
21. LIPMAN C. B. — Toxic and antagonistic effects of salts as related to ammonification by « *Bacillus subtilis* ». *Botan. Gaz.*, vol. 48, 1909, p. 105.
22. LOCHHEAD A. G. — Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Canadian Journ. Research*, vol. 10, 1934, p. 275.
23. LOEB J. — Ion series and the physical properties of protein. - III. The action of salts in low concentration. *Journ. Gen. Physiol.*, vol. 3, 1920, p. 391.
24. MAC LEOD R. A. — Dependence of the toxicity of cations for lactic acid bacteria on pH and incubation time. *Jour. Bact.*, vol. 67, 1954, p. 23.

25. MARKUS S. — *Helv. Chim. Acta*, vol. 31, 1948, p. 831, in SNELL F. D. e SNELL C. T. — *Colorimetric methods of analysis.*, vol. III, parte I, ed. Van Nostrand, New York, 1953, p. 348.
26. MAC ILVAINE T. C. — A buffer solution for colorimetric comparison. *Journ. Biol. Chem.*, vol. 49, 1921, p. 183.
27. MORSE H. N. — The osmotic pressure of aqueous solutions. *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, 198, 1914.
28. PAESSLER J. — Ueber des Salzen von Hauten und Fellen. *Collegium*, vol. 508, 1912, p. 379.
29. PETROWA E. K. — Mikrobiologie des Kochsalzes. *Arch f. Mikrobiol.*, vol. 3, 1933, p. 326.
30. RILEY W. H. — A study of factors causing lysis of a marine bacterium. *Thesis, Univ. of Florida, Gainesville, Florida*, 1955.
31. SHAUGHNESSY H. J., WINSLOW C. E. — The diffusion products of bacterial cells as influenced by the presence of various electrolytes. *Jour. Bact.*, vol. 14, 1927, p. 69.
32. SHERMAN J. M., CAMERON G. M. — Lethal environmental factors within the natural range of growth. *Jour. Bact.*, vol. 27, 1934, p. 341.
33. STUART L. S. — The growth of halophilic bacteria in concentrations of sodium chloride above three molar. *Jour. Agr. Research*, vol. 61, 1940, p. 259.
34. STUART L. S., JAMES L. H. — Effect of sodium chloride on the Eh of protogenous media. *Jour. Bact.*, vol. 35, 1938, p. 369.
35. STUART L. S., FREY R. W., JAMES H. L. — Microbiological studies of salt in relation to the reddening of salted hides. *U. S. Dept. Agr. Tech. Bull.*, n. 383, 1933.
36. WINSLOW C. E., DOLLOFF A. F. — Relative importance of additive and antagonistic effects of cations upon bacterial viability. *Jour. Bact.*, vol. 15, 1928, p. 67.
37. WINSLOW C. E., HAYWOOD E. T. — The specific potency of certain cations with reference to their effect on bacterial viability. *Jour. Bact.* vol. 22, 1931, p. 49.
38. ZO BELL C. E., MICHENER H. D. — A paradox in the adaptation of marine bacteria to hypotonic solutions. *Science*, vol. 87, 1938, p. 328.